

THÈSE

présentée

A LA FACULTE DE PHARMACIE DE NANCY

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANCY

MENTION « PHARMACIE »

par

JANINE BARRIER

PHARMACIEN

Ex-Assistante de Chimie Biologique
Diplômée d'Etudes Supérieures de Chimie Biologique
et de Biochimie Pharmaceutique et Technique
Diplômée d'Etudes Supérieures de Microbiologie
Diplômée d'Etudes Spéciales de Sérologie
Lauréate de la Faculté

née le 29 Mai 1928, à PARIS

Etudes sur la Détermination de la Cholestérolémie

- I - Séparation des stérides à l'aide de l'alumine
 - II - Dosage du cholestérol par la méthode au chlorure ferrique
-

Soutenue le 16 Décembre 1960, devant la Commission d'Examen

JURY :

Président..... M. le Doyen KAYSER
Juges..... M^{lle} BESSON
 M. PIERFITTE

UDART & CLEMENT

RELIEURS

11, RUE SAINTE-ANNE, 11

TÉLÉPH. 52.80.09 - NANCY



THÈSE

présentée

A LA FACULTE DE PHARMACIE DE NANCY

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANCY

MENTION « PHARMACIE »

par

JANINE BARRIER

PHARMACIEN

Ex-Assistante de Chimie Biologique
Diplômée d'Etudes Supérieures de Chimie Biologique
et de Biochimie Pharmaceutique et Technique
Diplômée d'Etudes Supérieures de Microbiologie
Diplômée d'Etudes Spéciales de Sérologie
Lauréate de la Faculté

née le 29 Mai 1928, à PARIS

Etudes sur la Détermination de la Cholestérolémie

- I - Séparation des stérides à l'aide de l'alumine
- II - Dosage du cholestérol par la méthode au chlorure ferrique

Soutenue le 16 Décembre 1960, devant la Commission d'Examen

JURY :

Président..... M. le Doyen KAYSER
Juges..... M^{lle} BESSON
M. PIERFITTE

UNIVERSITE DE NANCY
FACULTE DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

DOYEN

Professeur : F. KAYSER

ASSESSEUR

Professeur : A. MEUNIER

SECRETAIRE

B. SEUROT

Personnel Enseignant

Professeurs

M.	MEUNIER A.	Pharmacie galénique
Melle	FRANCOIS M. Th.	Matière médicale
MM.	KAYSER F.	Chimie
	FRANQUET R.	Botanique
	MARCHAL J. C.	Microbiologie
	STEIMETZ E.	Sciences Naturelles
	BLOCH J. M.	Toxicologie
	SOLEIL J.	Pharmacie chimique
	BERNANOSE A.	Physique
Melle	BESSION S.	Pharmacodynamie

Maîtres de Conférences-Agrégés

M.	BENE R.	Microbiologie
M.	PIERFITTE M. (délégué)	Chimie biologie
M.	MIRJOLET M. (délégué)	Sciences physico-chimiques

Chargés de cours complémentaires

M.	MEUNIER A.	Hydrologie
Melle	FRANCOIS M. Th.	Hygiène
MM.	KAYSER F.	Biochimie technique
	FRANQUET R.	Cryptogamie
	MARCHAL J. C.	Parasitologie
	STEIMETZ E.	Mycologie - Minéralogie
	BIOCH J. M.	Chimie minérale
	SOLEIL J.	Chimie organique
	BERNANOSE	Optique et Acoustique
	GRANGER (Professeur à la Faculté de Droit)	Déontologie
Melle	BESSION S.	Techniques spéciales et méthodes modernes d'analyses
M.	BENE R.	Bactériologie
M.	ANZIANI P.	Caractères analytiques des sels

Mme	LASSEUR A.	Techniques spéciales d'analyses bactériologiques
MM.	MIRJOLET M. PIERFITTE M.	Chimie analytique C. E. S. Chimie biologique
Melle	HEINRICH S.	Matière médicale.

Chefs de Travaux

M.	ANZIANI P.	Chimie
Mme	LASSEUR A.	Microbiologie - Parasitologie
MM.	VILLOUTREIX J. (stagiaire)	Micrographie
	MARTIN J. A. (délégué)	Chimie
Melle	GIRARD Th. (déléguée)	Microbiologie technique
Melle	LAURENT F. (déléguée)	Physique
Melle	DAUCHY S. (déléguée)	Chimie biologique
Melle	HEINRICH S. (déléguée)	Sciences pharmaceutiques

Doyen Honoraire : M. RICHARD, Recteur de l'Académie de Montpellier

Professeurs Honoraires : M. CORDEBARD - M. DOURIS



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555809_0021

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Doyen KAYSER
Professeur de Chimie

A NOS JUGES

Mademoiselle BESSON
Professeur de Pharmacodynamie

Monsieur PIERFITTE
Maître de Conférences délégué

A TOUS NOS MAITRES

de l'Ecole de Médecine et de Pharmacie de Reims
de la Faculté de Pharmacie de Nancy.

A MA GRAND ' MERE

A MA MERE

A MA TANTE,

qui m'ont toujours entourée de leur affection si précieuse.
En témoignage de ma profonde reconnaissance.

A Mademoiselle Françoise BERNARD, Docteur en
Médecine, dont j'ai maintes fois apprécié le dévouement et
la sincérité. Qu'elle trouve ici l'expression de mon affectueuse
amitié.

AVANT - PROPOS

Avant de présenter les résultats de notre Travail, nous tenons à exprimer nos respectueux remerciements à tous ceux qui en ont permis l'élaboration.

Lorsque Monsieur le Doyen KAYSER, à la fin de son cours de Chimie Biologique de 4ème année nous fit savoir qu'on pouvait parfaire nos connaissances en préparant un Certificat d'Etudes Spéciales en cette Faculté, nous ne manquions pas de nous y inscrire. Cette année de travail décida de notre orientation actuelle. Elle nous fut doublement profitable. D'un point de vue théorique par l'Enseignement précis et complet que nous donnèrent nos Maîtres : Monsieur le Doyen KAYSER, Mademoiselle BESSON, Monsieur BERNANOSE. Sur un plan pratique, Monsieur PIERFITTE voulut bien nous proposer comme Monitrice. Nul n'ignore l'avantage que l'on peut tirer d'un stage au laboratoire.

Malgré de nouvelles fonctions administratives, Monsieur le Doyen KAYSER a bien voulu accepter de présider le Jury de cette thèse. Qu'il veuille trouver ici l'expression de notre sincère gratitude et de notre respectueuse reconnaissance.

Mademoiselle BESSON a été pour nous beaucoup plus qu'un Maître de thèse. Régulièrement, elle a suivi l'évolution de nos expériences et nous avons toujours trouvé à son contact l'enthousiasme inaltérable, le soutien moral, la parole encourageante qu'en dépit de ses nombreuses activités, elle distribue à tous ceux qui ont la chance de travailler sous ses directives. Qu'il nous soit permis de l'assurer de notre respectueux attachement et de notre profonde admiration.

Monsieur PIERFITTE nous avait confié un premier travail relatif au dosage du cholestérol par le chlorure ferrique. En collaboration avec Mademoiselle BESSON, il a pensé qu'il serait intéressant de poursuivre en cette voie. C'est ainsi qu'est né le sujet de cette thèse. Nous avons toujours suivi avec intérêt et profit ses conseils avisés et sûrs. Qu'il veuille être assuré de notre sympathique reconnaissance.

INTRODUCTION

Le sérum sanguin contient des lipides auxquels par commodité on rattache toujours le cholestérol qui les accompagne et qui s'extrait par les mêmes procédés.

Etat du cholestérol dans le sérum sanguin .

Tandis que les hématies ne contiennent que du cholestérol non estérifié, le plasma renferme le cholestérol sous deux formes dites cholestérol libre et cholestérol estérifié. Ce terme "libre" a prêté à confusion, mais, comme l'a rappelé TAYEAU (81), il n'y a pas de cholestérol vraiment libre dans le plasma, le terme libre consacré par l'usage signifie ici : non estérifié.

On connaît peu de chose sur les acides gras constituant les esters de cholestéryle car jusqu'à une époque récente on ne disposait pas de méthodes satisfaisantes pour les séparer des triglycérides. Par ailleurs, les résultats obtenus dans une espèce animale ne sont pas transposables à une autre (16).

En ce qui concerne le sérum humain, on sait que ces esters sont essentiellement constitués par les acides palmitique, oléique, linoléique. (14) (30) (44) (57).

A côté du cholestérol existeraient une ou plusieurs substances voisines : TRAPPE (85) décèle une substance ayant moins d'affinité pour l'alumine que le cholestérol et ses esters et donnant une réaction de LIEBERMANN positive. DEVIS (22) identifie dans certains sérums des produits précipitant avec le digitonoside et présentant la réaction de LIEBERMANN. L'auteur cite le cas d'un diabète non compensé où 30 % du cholestérol dosé comme tel par la méthode de SCHOENHEIMER-SPERRY, n'en était pas. Plus récemment encore, MIKOL (58) attire l'attention sur l'apparition d'une substance voisine du cholestérol dans certaines affections où l'hypercholestérolémie déterminée par la réaction de LIEBERMANN ne s'accompagne pas de manifestations cliniques. Il semble que la Δ^5 prégénolone soit une des principales substances mises en cause.

Liaison du cholestérol aux protéines.

On lit dans un travail de GARDNER et GAINSBOROUGH (29) que l'association des substances liposolubles du sérum aux protéines est connue depuis longtemps, comme en témoignent les publications de HARDY (1905) - HASLAM (1913) - CHICK (1914), mais BANG est le premier à avoir précisé dès 1913 la combinaison du cholestérol aux protéines, et tout particulièrement aux globulines. Des publications ultérieures confirment cette affinité des globulines pour le cholestérol.

Mais il faut attendre les propres travaux de GARDNER et GAINSBOROUGH (29) pour avoir la première répartition chiffrée du cholestérol dans le sérum :

Les trois fractions suivantes de protéines renferment en % du cholestérol

	<u>Libre</u>	<u>E stérifié</u>
Euglobulines	90,34	82,4
Pseudo-globulines	2,64	6,05
Albumine	7	11,5

Ensuite sont venus les travaux désormais classiques de MACHEBOEUF (54) et de ses élèves sur les cénapses lipoprotéiques.

Depuis que l'électrophorèse a permis de décomposer en fractions nettement distinctes les protéines du sérum, de nouvelles études ont été faites sur la répartition du cholestérol entre ces fractions.

Lipoprotéines alpha et lipoprotéines bêta.

On distingue essentiellement deux groupes importants de lipoprotéines : les lipoprotéines alpha-1 et les lipoprotéines bêta.

En fait cette terminologie paraît regrettable dans sa précision car si le déplacement électrophorétique coïncide à peu près avec celui des alpha et celui des bêta globulines, il n'a jamais été possible de les isoler correctement et certains préfèrent les dénommer lipoprotéines de forte densité et lipoprotéines de faible densité (49). Nous garderons néanmoins les désignations alpha et bêta qui situent, approximativement au moins, ces lipoprotéines dans l'échelle des vitesses de migration.

Le fractionnement des protéines par l'éthanol froid, suivant la méthode de COHN, place les lipoprotéines alpha dans la fraction IV, les lipoprotéines bêta dans les fractions I et II.

Les protéines incluses dans ces complexes lipidiques ne représentant qu'une très faible part des protéines du sérum ; on estime le taux des protéines des lipoprotéines alpha à 2 g environ et celui des lipoprotéines bêta à 3 g - 3,50 g par litre de sérum.

L'ultracentrifugation permet de distinguer deux groupes dans chaque sorte de lipoprotéines : les lipoprotéines alpha (dites de forte densité) se répartissent en deux groupes dont les densités respectives sont 1,21 - 1,125 et 1,125 - 1,063. Les lipoprotéines bêta (dites de faible densité), se répartissent en deux autres groupes de densités 1,063 - 1,019 et 1,019 - 1,006.

La composition lipidique de ces cénapses lipido-protéiques est très différente. De plus les chiffres publiés varient, en particulier, avec les pays (49).

Voici les chiffres indiqués par EDER (23) et auxquels se réfèrent LEWIN et coll (50).

Composition p. 100 des fractions lipoprotéiques du plasma.

Densité des fractions	Cholestérol		Phospho lipides	Trigly-cérides	Protéines
	Libre	estérifié			
D 1,006 (Chylomicrons)	3,1	6	7,1	81,3	2,5
1,006-1,019	6	16,2	17,9	51,8	7,1
1,019-1,063 (Lipoprotéines bêta)	7,5	39,4	23,1	9,3	20,7
1,063-1,21 (Lipoprotéines alpha)	2	17,4	26,1	8,1	46,4

Les chiffres figurant dans ce tableau traduisent la très inégale richesse en lipides des lipoprotéines : tandis que la composante lipidique représente la moitié du poids des lipoprotéines alpha, elle représente 80-90 % du poids des lipoprotéines bêta.

Si on tient compte du taux de lipoprotéines dans le sérum, on peut calculer la quantité de cholestérol lié à chacune des fractions (10) :

Les lipoprotéines alpha contiennent 0,35 g à 0,90 g de cholestérol par litre, soit 20 à 40 % du cholestérol total. Le cholestérol des lipoprotéines bêta varie de 0,80 g à 2,50 g (soit 60 à 80 % du cholestérol total).

Les lipoprotéines bêta portent donc une charge lipidique plus importante que les lipoprotéines alpha et contiennent également davantage de cholestérol.

A côté de ces deux principales fractions de protéines chargées de cholestérol, existent aussi dans le sérum d'une part des lipoprotéines très rapides, mal connues, d'autre part les chylomicrons. Les résultats rapportés ici montrent que ces derniers sont essentiellement constitués par des lipides et qu'ils ne contiennent que 2,5 % de protéines.

Suivant SCANU et PAGE (71) l'élément protéique appartient à des lipoprotéines alpha et bêta qui portent, adsorbé, un supplément de lipides.

Extractibilité du cholestérol.

La proportion très faible de lipides extraits par agitation directe du sérum avec de l'éther a été attribuée à la présence des combinaisons lipidiques de l'albumine qui seraient peu stables. Cette fraction lipidique augmenterait en effet quand la quantité d'albumine du sérum augmente (29).

En 1939, TAYEAU (79) reprenait l'étude de la stabilité des liaisons lipides-protides dans le sérum sanguin.

Plus récemment deux autres tests de stabilité ont été utilisés : LEMAIRE et coll (48) adsorbent le sérum sur du papier et notent la quantité de cholestérol extraite par divers solvants en fonction du temps. Nous reproduisons ci-après les résultats obtenus, en adoptant les signes suivants

- = = extraction identique à celle du sérum témoin
(sujet sain)
- = extraction inférieure à celle du sérum témoin
(sujet sain)
- + = extraction supérieure à celle du sérum témoin
(sujet sain).

Solvants	Ether	Chloroforme		Trichloréthylène	
Temps de contact	1/4 h	1/4 h	24 h	1/4 h	24 h
Témoin	=	=	=	=	=
Diabète	=	=	=	+	+
Athéromateux	-	=	+	+	+
Infarctus du myocarde	+	=	=	=	+
Néphrose	+	+	+	+	+

MIKOL (59) pratique une chromatographie sur papier de sérums bruts et de leurs extraits lipidiques. Il n'y a pas de migration dans le cas de sérums sains ou provenant de diverses affections, ce qui montre que les cénapses sont stables. Au contraire une tache, mise en évidence par la réaction de Liebermann, décèle une migration quand le sérum ou l'extrait lipidique proviennent d'athéromateux.

Ces deux sortes de travaux concluent donc a une labilité plus grande des cénapses chez les athéromateux et dans d'autres affections (en particulier le diabète) que chez le sujet sain.

D'après les recherches de LEMAIRE et coll (48), à l'état normal, les lipoprotéines bêta libèrent plus facilement leur cholestérol que les lipoprotéines alpha, mais cette libération n'est pas augmentée chez le malade. Au contraire, toute augmentation d'extractibilité porte sur le cholestérol des alpha protéines. Etant donné, comme nous l'avons vu, que la variation quantitative du cholestérol chez le malade porte sur les bêta lipoprotéines, il apparaît que les alpha lipoprotéines présentent un autre genre de variation. Il serait sans doute intéressant de voir quelle est la fraction du cholestérol estérifié ou libre des alpha lipoprotéines qui se montre plus extractible.

Intérêt actuel du dosage du cholestérol et de ses esters.

Un chiffre de cholestérol total dans le sérum d'un malade, même athéromateux, est un bien faible appoint dans la symptomatologie de cette affection. La détermination du pourcentage de cholestérol estérifié dans ce cholestérol total a paru, sur une base théorique, avoir une signification dans l'examen de la fonction hépatique. Il a bien fallu reconnaître, comme l'a écrit nettement TAYEAU (80) que : "Tous les auteurs semblent d'accord pour reconnaître l'effondrement du rapport cholestérol estérifié/cholestérol total dans les processus parenchymateux dégénératifs prémortels, c'est-à-dire à un stade où la biologie n'est généralement plus d'un très grand secours. A part ces cas très particuliers, il paraît difficile d'attribuer une réelle valeur diagnostique au rapport cholestérol estérifié/cholestérol total".

Après tant de déceptions, le dosage du cholestérol aurait été délaissé s'il n'avait acquis un regain d'actualité avec l'attribution aux lipoprotéines bêta d'un rôle important dans la genèse de l'athéromatose.

Voici d'après CASTAIGNE et AMSELEN (13), la répartition comparée du cholestérol libre et de ses esters dans les lipoprotéines d'un sujet sain et d'un sujet atteint d'hypercholestérolémie :

Taux de cholestérol total (T) estérifié (E) libre (L) chez le sujet normal et le sujet hypercholestérolémique.

	<u>Sujet normal</u>				<u>Sujet hypercholestérolémique</u>			
	T	E	L	E/T	T	E	L	E/T
Sérum	1,86	1,56	0,30	0,85	4,44	2,76	1,68	0,62
Lipoprotéines								
alpha	0,68	0,58	0,10	0,85	1,29	1,10	0,19	0,85
bêta	1,20	1,01	<u>0,19</u>	<u>0,84</u>	3,15	1,44	<u>1,72</u>	0,45

Nous avons souligné les chiffres qui mettent en évidence l'augmentation importante du cholestérol libre des bêta lipoprotéines chez le malade. Cette augmentation est responsables de l'élévation du cholestérol total de cette fraction

La diminution du taux d'estérification est essentiellement provoquée par l'élévation du cholestérol libre des béta lipoprotéines. C'est le cas pathologique des hyper cholestérolémies. Par contre , on a montré que si une cholestérolémie élevée se rencontre sans troubles apparents, le taux d'estérification du cholestérol des lipoprotéines béta est voisin de la normale. (13)

En d'autres termes, toute modification pathologique du cholestérol du sérum traduit une modification du cholestérol porté par les lipoprotéines béta. Si bien qu'un dosage de cholestérol correspond à une exploration des lipoprotéines-béta. En fait, il y a à peu près parallélisme entre l'élévation du cholestérol et l'élévation des lipoprotéines béta. Cependant la rapidité d'estimation des lipoprotéines béta grâce aux méthodes de BURSTEIN et coll (9) (10) (11) fait préférer en clinique cette estimation globale à un dosage de cholestérol.

Il n'en reste pas moins qu'actuellement l'intérêt du cholestérol (total, libre, estérifié) réside dans sa présence et sa variation dans les lipoprotéines béta.

1ère P A R T I E

SEPARATION DES STERIDES A L'AIDE DE L'ALUMINE

1. APERCU SUR LES DIFFERENTES METHODES DE SEPARATION

La séparation du cholestérol libre de ses esters peut actuellement être réalisée par plusieurs méthodes. Nous en distinguerons trois sortes.

A - Combinaison du cholestérol libre

a) au digitonoside

C'est la méthode classique, bien connue, nous nous contentons d'en rappeler le principe. Le cholestérol libre forme avec le digitonoside un complexe (digitonide) dont l'insolubilité dans certains solvants en permet l'isolement. L'analyse peut porter sur ce complexe ou sur les esters de cholestéryle restés en solution.

b) à d'autres substances

ZWIKKER (96) a fait appel à la précipitation du cholestérol non estérifié par le chlorure de lithium en milieu pyridine : il se forme un complexe cristallisé de cholestérol-pyridine-chlorure de lithium.

Dans la méthode proposée par SOBEL, DREKTER, NATELSON (76) le cholestérol non estérifié est précipité par le sulfate de pyridine : le complexe sulfate de pyridine-cholestérol obtenu est insoluble dans l'éther de pétrole. La technique a l'avantage d'être applicable à une prise d'essai de sérum aussi faible que 0,2 ml mais les conditions requises pour la formation du complexe sont délicates à réaliser.

Ultérieurement SOBEL, GOODMAN, BLAU (77) ont perfectionné cette première méthode, mais l'interprétation qu'ils donnent de leurs résultats est imprécise. En effet, ces auteurs disent que le cholestérol ainsi dosé ne représente qu'une fraction de cholestérol non estérifié, celle qui n'est pas liée aux protéines ; puis, à la fin de leur publication, ils conseillent "si on manque de temps" de considérer le chiffre obtenu comme pratiquement identique à celui qu'on obtiendrait par précipitation au digitonoside.

TALIBERTI (78) montre que la technique précédente comporte une erreur de 10 à 12 %. Il la rend plus exacte en employant le sulfate de 8-hydroxyquinoléine en milieu anhydride acétique-pyridine. Le complexe cholestérol-pyridine-8 hydroxyquinoléine est insoluble dans l'éther de pétrole, soluble dans l'acide acétique. Le dosage se termine par une réaction de LIEBERMANN.

B - Séparation par solvants

KANNER (38) a publié en 1931 une méthode qui figure encore actuellement dans les techniques indiquées par des constructeurs de photomètres, bien qu'elle ait été très critiquée. Le principe consiste dans la substitution de l'éther de pétrole à l'éther éthylique dans l'extraction du cholestérol par la méthode de GRIGAUT. Contrairement à l'éther éthylique ce solvant n'entraînerait pas la totalité du cholestérol, mais seulement sa fraction non estérifiée.

Le point particulier de la technique réside en une agitation vigoureuse, une douzaine de fois.

L'auteur a prouvé que le produit entraîné est totalement précipitable par le digitonose. Il s'agit donc bien de cholestérol libre.

Les travaux de KANNER ont été repris par KHALYL (42). Cet auteur apporte la preuve que la substance extraite par l'éther de pétrole non seulement est bien du cholestérol libre mais de plus ne contient pas d'esters puisqu'après saponification la valeur trouvée est identique à celle obtenue avant saponification.

Il faut reconnaître que, au moins dans les cas de cholestérolémies à peu près normales, le résultat coïncide avec celui que donne la combinaison au digitonose. Cependant les expériences de PIERRART (65) ébranlent la confiance qu'on donnerait à cette méthode ; le résultat obtenu dépend du mode d'agitation et de sa durée.

Maintenant que nous connaissons mieux les liaisons plus ou moins solides du cholestérol dans le sérum sanguin, on serait plutôt tenté d'interpréter les chiffres obtenus dans la méthode de KANNER comme ceux d'un cholestérol particulièrement labile. Le cholestérol libre serait-il plus labile que le cholestérol estérifié ? Les expériences que nous avons rapportées (p. 4 et 5) laissent entrevoir que la question est plus complexe.

C - Séparation par chromatographie

Nous citerons pour commencer la méthode de chromatographie sur papier, bien qu'elle soit postérieure à la chromatographie sur colonne, parce que nous n'apportons pas ici de contribution personnelle sur ce procédé.

LIEBESCHUTZ (51) reprend la technique de KANNER. Il imbibe deux bandes de papier Whatmann de 0,2 ml de sérum. Après dessiccation, l'une est mise à tremper dans du méthanol (qui extrait tout le cholestérol), l'autre dans de l'éther de pétrole (Eb. 60-65°) qui n'extrait que le cholestérol libre. L'extraction menée à l'étuve à 37° ne demande que quelques heures.

MICHALEC (56) CORMIER, BOULVARD, JOUAN (17) MIKOL (58) pratiquent la chromatographie des extraits lipidiques sur papier imprégné de paraffine ; seul l'éluant varie avec les auteurs. QUAIFFE et GEYER (66) emploient un papier imprégné de carbonate de zinc et HANSEN et DAM (32) un papier sans imprégnation. Dans ces deux dernières méthodes le cholestérol des spots est évalué par une réaction avec le perchlorure de fer (réaction que nous étudierons de près dans la IIème partie de ce travail).

Tout récemment, MARINETTI et STOTZ (55) proposent à nouveau une chromatographie du sérum, sans extraction préalable des lipides.

La chromatographie sur colonne nous retiendra davantage puisqu'elle a été le point de départ de nos recherches.

II - ETUDE PARTICULIERE DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE.

A - Etudes préliminaires de TRAPPE

a - Adsorption des lipides en solution organique mise au contact d'adsorbants.

1° - Adsorbants

TRAPPE (84) a étudié les propriétés de divers adsorbants dans le but de les comparer entre eux et de trouver les meilleures conditions d'absorption.

a) le tassement de l'adsorbant sous l'effet d'une centrifugation bien déterminée se montre en relation avec la ténuité du grain et permet de différencier deux albumines de même densité.

b) L'humidité est un facteur important du pouvoir adsorbant. Pour un adsorbant donné le pouvoir d'adsorption est maximum quand la dissipation est maximum. TRAPPE cite l'exemple d'acide silicique du commerce qui adsorbe 17,4 % de l'acétate de cholestéryle qui lui est présenté en solution dans le trichloréthylène, tandis que desséché il en retient 79,2 %.

2° - Solvants

A l'issue d'expériences portant sur 28 adsorbants, 30 solvants et 16 substances lipidiques, TRAPPE (84) s'est trouvé un résultats inattendu à savoir que les solvants se classent suivant un ordre d'élution qui est indépendant de l'adsorbant et de l'adsorbé. Il détermine ainsi "la série éluotrope" de solvants. C'est cette classification qui est en général rapportée dans les ouvrages (VELLUZ) (90).

Il nous paraît intéressant de faire figurer dans notre travail, les données précises de TRAPPE puisqu'elles sont à la base de la séparation des fractions de cholestérol.

Pourcentages d'adsorption du cholestérol et de ses esters
sur alumine et silicate d'alumine en présence de différents solvants.
(TRAPPE)

SOLVANTS	Silicate d'alumine désséché		Alumine désséchée d'après Brockmann .	
	libre	cholestérol estérifié (stéarate)	libre	cholestérol estérifié (acétate)
Alcool éthylique			4,4	
Alcool propylique			2,8	
Acétone			3,8	
Acétate d'éthyle			14,8	
Ether éthylique			63,1	
CH Cl ₃			24,5	
Chlorure de méthyle			53,2	
Benzol	75,5		95,1	11,2
Toluol	78,6			12,8
Trichloréthylène	86,3			22,4
CCl ₄	96,4	21,6		53,1
Cyclohexane	99,2	85,9		96,8
Ether de pétrole (ébull. 30°-50°)	100	94		97,9

Les chiffres figurant dans le tableau montrent que la valeur d'adsorption dépend de l'adsorbant : l'alumine se montre beaucoup plus active que le silicate d'alumine.

Nous remarquons une exception que ne manque pas de faire remarquer TRAPPE, sans l'expliquer : l'adsorption du cholestérol sur alumine, en présence d'éther est beaucoup plus élevée que ne le voudrait l'ordre éluotrope (établi par l'auteur sur l'adsorption de l'acide oléique sur silicate d'alumine).

TRAPPE souligne que les constantes physiques des solvants s'alignent parallèlement à la série d'élution. Par exemple, la solubilité de l'eau dans chacun des solvants, passe de 3 % pour l'acétate d'éthyle à 0,007 % pour l'éther de pétrole.

TRAPPE confirme par ailleurs son ordre éluotrope de solvants par quelques repères indiqués antérieurement par GUREWITSCH, comparant l'adsorption de l'acide benzoïque et de la paraffine sur floridine.

Comme les lipides, dit l'auteur (85), ne diffèrent guère dans leur adsorption, il faut utiliser leur différence de vitesse de migration sur l'adsorbant qui est beaucoup plus marquée. De là est née la méthode de séparation, par chromatographie, du cholestérol et de ses esters, utilisée, la première fois, par TRAPPE.

b - Adsorption des lipides sur colonne adsorbante traversée par des solvants (85)

1° - Adsorbants

L'adsorbant est placé dans des tubes de dimensions bien déterminées et fermés à leur partie inférieure par une plaque filtrante (la capacité et les caractéristiques des tubes sont très différentes s'il s'agit d'alumine ou d'acide silicique par exemple).

2° - Solvants

Le solvant est analysé à la sortie de la colonne d'absorbant. Nous n'indiquons ci-dessous que des chiffres concernant le cholestérol et un de ses esters après passage sur alumine et acide silicique.

Pourcentage d'adsorption du cholestérol et du stéarate de cholestéryle (TRAPPE)

Sur alumine			Sur acide silicique		
Solvant	Cholestérol	ester (stéarate)	Solvant	Cholestérol	Ester (stéarate)
Ether de pétrole (Eb. 30-50°)	100	95,1	Ether de pétrole	100	99
CCl ₄	97,5	14	Trichloréthylène	98,2	22,2
Benzol	89	0			
CH Cl ₃	16,8	0	Ether éthylique	0	0

Ce tableau montre nettement que le cholestérol et ses esters se laissent éluer de façon très différente par un même solvant. On voit par exemple que sur alumine, dans les conditions utilisées par l'auteur, l'éther de pétrole n'entraîne pas du tout le cholestérol libre (qui reste absorbé en totalité soit 100 %) tandis qu'il enlève 5 % de l'ester. Egalement sur alumine, le cholestérol reste fixé dans la proportion de 97,5 % après élution par CCl₄, de 85 % après élution par benzol et 16,8 % après élution par CHCl₃. Avec ces deux derniers solvants, au contraire, le cholestérol estérifié est totalement entraîné et il n'en reste plus du tout sur l'adsorbant.

On conçoit aisément qu'on puisse jouer sur la nature de l'éluant et la nature de l'adsorbant pour séparer le cholestérol et les esters.

3° - Application à l'analyse d'un mélange lipidique.

Sur des mélanges lipidiques de composition connue, TRAPPE (85) récupère d'une colonne d'alumine (de capacité et dimensions données) la totalité du stéarate de cholestéryle introduit, en trois lavages de 25 ml de CCl₄, et les lavages supplémentaires n'éluent pas le cholestérol libre, qui reste absorbé.

Sur colonne d'acide silicique, deux lavages de 25 ml au trichloréthylène entraînent tout le stéarate, les lavages supplémentaires ne contiennent pas de cholestérol. Pour obtenir le cholestérol non estérifié, il faut poursuivre le lavage de la colonne par de l'éther éthylique, deux lavages par 25 ml chacun suffisent.

Il résulte de ces expériences que les esters de cholestéryle sont moins fortement adsorbés que le cholestérol libre, d'où la possibilité de les extraire d'un adsorbant sans toucher au cholestérol.

C'est ainsi que se trouve fondée la méthode de séparation du cholestérol de ses esters par chromatographie sur colonne.

B - Analyse des méthodes utilisant l'acide silicique et l'alumine.

Nous avons à dessein cité les expériences de TRAPPE sur l'alumine et acide silicique car ce sont ces deux substrats qui, à l'heure actuelle, sont utilisés dans la séparation du cholestérol de ses esters.

Ils comportent l'un et l'autre des avantages et des inconvénients :

1° - Des risques d'erreur portant sur l'adsorption silicique proviendraient des solvants. TRAPPE (85) attire l'attention sur la présence éventuelle d'HCl dans le trichloréthylène : en effet, HCl catalyse sur acide silicique une transformation du cholestérol et de ses esters, se traduisant par une coloration rouge bleue de l'adsorbant et une rétention du produit. Comme le trichloréthylène libère HCl à la lumière, il faut le conserver sur carbonate de sodium ou sur chaux et le filtrer au moment d'en faire usage.

D'autre part, l'acide silicique doit renfermer une quantité d'eau convenable pour une bonne séparation.

FILLERUP et HEAD (25) pensent que l'acide silicique est préférable à l'alumine en raison d'une altération possible des lipides sur cette dernière (faisant état des modifications notées par TRAPPE que nous signalons ci-dessous) et surtout sans doute parce que ces auteurs n'ont pu obtenir une séparation du cholestérol de ses esters en suivant les indications de HESS (35) MICHAELIS et coll. (57)

2° - Quant à l'alumine, TRAPPE (85) (86) a mentionné une saponification des triglycérides et une auto-oxydation des acides gras libres, mais spécifie bien que les esters du cholestérol ne subissent aucun changement (86). Dans les solvants contenant HCl ou SO₂, le cholestérol subit par passage sur adsorbants alcalins activés par un long chauffage à 120° la même altération que celle qui est signalée sur acide silicique (86).

a) - Méthodes utilisant l'acide silicique

Les techniques basées sur l'adsorption sur acide silicique sont rassemblées dans le tableau p. 18. Les différences essentielles portent sur la nature des éluants du cholestérol estérifié et du cholestérol libre et sur la réaction colorée utilisée pour le dosage.

- La très ancienne réaction de TSCHUGAEFF (in FRECHIN) (28) connaît une grande faveur en raison de la stabilité de la coloration rouge obtenue (contrairement à la réaction de LIEBERMANN-BURCHARD) et de sa sensibilité. Nous la retrouverons d'ailleurs dans des techniques utilisant l'alumine. Cette réaction consiste à porter à l'ébullition une solution acétique de cholestérol, de chlorure d'acétyle et de chlorure de zinc.

- La réaction de PEARSON - STERN - Mac GAVACK (61) est une réaction de LIEBERMANN-BURCHARD modifiée par l'introduction d'acide paratoluène sulfonique.

L'orcinol (57) est un réactif du digitonoside complexé au cholestérol. C'est donc une méthode longue, ne présentant pas d'intérêt pratique.

- Quant à la réaction au perchlorure de fer, nous y reviendrons longuement dans la IIème Partie de notre travail.

CHROMATOGRAPHIE SUR ACIDE SILICIQUE.

AUTEURS	Mode d'extraction	Solvant pour chromatographie	Caractéristiques de l'adsorbant	Eluants du cholestérol		Réaction colorée utilisée
				Estérifié	libre	
FILLERUP MEAD (1953) (25)	Méthylal Méthanol	Ether de pétrole		Ether de pétrole contenant 1 % éther	10 % éther	TSCHUGAEFF
WYCOFF- PARSONS (1957) (92)	Méthanol Acétone	Ether de pétrole	acide silicique activé par chauffage	chloroforme + éther de pétrole	acétate d'éthyle + éther de pétrole	Fe Cl ₃
MICHAELS et coll. (1958) (57)	Alcool Acétone	Ether de pétrole	Acide silicique + célite	Ether de pétrole		Orcinol - Fe Cl ₃
VANHANDEL (1959) (31)				chloroforme + éther de pétrole	chloroforme	PEARSON et coll.

b - Méthodes utilisant l'alumine

Nous avons groupé en un tableau récapitulatif les diverses méthodes de séparation sur alumine du cholestérol estérifié et non estérifié (tableau p. 20).

Nous allons analyser les divers points de ces techniques.

1° - Prise d'essai

Elle varie de 0,1 à 1 ml. Il s'agit donc de micro et de semimicrométhodes.

2° - Mode d'extraction

Dans la première technique proposée par TRAPPE (87) l'isolement des lipides était assez original : le sang prélevé (0,1 ml) par piqûre au doigt était hémolysé dans un grand volume d'eau (50 ml). L'acide silicique hydraté SCHERING de Berlin ajouté au liquide dans la proportion de 2,5 g adsorbait quantitativement les lipides. Ce substrat était séparé par centrifugation, desséché et placé sur une colonne d'alumine qu'on éluait. Malheureusement, seul le produit fourni par la firme indiquée était capable d'une telle adsorption. C'est pourquoi, TRAPPE a eu recours ensuite à une extraction lipidique plus courante.

Les solvants de lipides utilisés sont classiques : l'alcool - éther de pétrole (BLOOR), l'alcool-acétone (KAYSER), le méthylal-méthanol (DELSAL), le trichloréthylène-méthanol-acétone (PAGET-PIERRART).

Mais aucun d'eux ne convient pour l'adsorption sur alumine. C'est pourquoi, les extraits obtenus sont évaporés et repris en général par de l'éther de pétrole (TRAPPE emploie le tétrachlorure de carbone). Une difficulté est la reprise totale du cholestérol par l'éther de pétrole qui dissout difficilement le cholestérol. C'est pourquoi AGNERAY et coll. préconisent la reprise des lipides par un peu de chloroforme (excellent solvant) et ajoutent ensuite de l'éther de pétrole. La proportion de ces deux solvants étant 1 à 20, cette présence de chloroforme n'empêche pas l'adsorption.

CHROMATOGRAPHIE SUR ALUMINE

AUTEURS	P. E. initiale	Mode d'extraction	Solvant pour chromatogra- phie	P. E. initiale ml	Caractéristiques de l'adsorbant	Eluant du cholestérol Estérifié	libre	Réaction colorée utilisée
TRAPPE (1942) (87)	0, 5 - 1	Alcool Ether de pétrole + SO ₄ Na ₂	CCl ₄	0, 125	4 g Al. st Brockmann (Merck)	C Cl ₄	CHCl ₃	TSCHUGAEFF
HESS (1947) (35)	1	Alcool Acétone (à chaud)	Ether de pétrole	0, 4	2, 5 g Al. st Brockmann (Merck)	Ether de pétrole contenant 10 % d'ether	10% alcool	LIEBERMANN BURCHARD
KEER BAULD (1953) (40)	0, 2	"	Ether de pétrole	0, 2	0, 2 alumine activité II	Ether de pétrole	benzène	LIEBERMANN BURCHARD
HENLY (1957) (33)	0, 2	"	Ether de pétrole	0, 2	0, 2 alumine activité II	Ether de pétrole	benzène	LIEBERMANN BURCHARD
HOUGET (1958) (37)	1	Ether Alcool	Ether de pétrole	1	Alumine activité II	Ether de pétrole puis CCl ₄	benzène	TSCHUGAEFF
SCHONGEY (1956) (73)	0, 1 - 0, 5				10 g alumine activité II	Ether de pétrole contenant 4 % d'ether	40% éther	TSCHUGAEFF
AGNERAY et coll (1968) (1)	2	Acétone Mé- thanol Tri- chloréthylène	Ether de pétrole + CH Cl ₃	1	5 g Al. st. Merck ou Al. Prolabo 0,7 g	Ether de pétrole + CH Cl ₃	CH Cl ₃ + (acétate d'éthyle)	LIEBERMANN BURCHARD
AGNERAY et coll (1959) (2)	0, 1			0, 1			CH Cl ₃	

3° - Caractéristiques de l'alumine utilisée.

L'alumine Merck, standardisée suivant BROCKMANN est bien identifiée. Il s'agit de l'alumine d'activité I à partir de laquelle BROCKMANN et SCHODDER (7) ont préparé une série d'alumines dont les pouvoirs d'adsorption vont en décroissant.

L'alumine d'activité II est obtenue par chauffage, suivant ces auteurs, de 4 à 6 heures en agitant fréquemment puis repos en couche mince. Elle doit être employée 30 minutes plus tard. Les alumines d'activité III, IV, V s'obtiennent en laissant reposer plus longtemps l'alumine I et en agitant en présence d'air humide.

Pour caractériser ces diverses activités, les auteurs repèrent sur des colonnes de telles alumines le comportement d'une série de colorants du groupe azo, soumis à une élution par un mélange benzol-benzène. Tandis que l'alumine d'activité I les retient tous, à mesure que l'activité diminue il passe de plus en plus de colorants dans l'éluat.

HESSE et coll (36) ont indiqué la quantité d'eau contenue dans ces alumines de diverses activités : respectivement 0,3, 6, 10, 15 % d'eau pour les activités I, II, III, IV, V.

On voit dans le tableau de la page 20 que certains auteurs ont utilisé l'alumine d'activité I, d'autres, l'alumine d'activité II. Cette diminution d'activité est d'ailleurs obtenue très simplement par KEER, et BAULD ainsi que par SCHON et GEY par addition des 3 % d'eau indiqués par HESSE et coll. (36).

Une suractivation par chauffage (conduisant à une deshydratation) n'a été mise à profit dans aucune des méthodes ayant cours en clinique, mais nous l'avons trouvée dans une publication (15) où les auteurs préconisent l'alumine chauffée à 180° pour obtenir une meilleure séparation du cholestérol de ses esters dans des extraits lipidiques tissulaires.

4° - Quantité d'alumine

La plupart des auteurs indiquent les dimensions des tubes servant à monter les colonnes d'alumine et le poids d'alumine utilisé.

TRAPPE (85) a précisé que la capacité de la colonne qu'il utilisait est suffisante si le rapport poids de lipide/poids d'alumine ne dépasse pas 1/75.

AGNERAY et coll. (1) ont vérifié, pour leur part, que 5 g d'alumine Prolabo n° 22.995 (°) étaient suffisants, dans leurs conditions opératoires, pour séparer des quantités de cholestérol de l'ordre de 10 mg

La quantité d'alumine utilisée par KEER et BAULD (40) : 0,20 g pour 0,3 à 0,5 mg de cholestérol correspond à un rapport maximum cholestérol/alumine = 0,002 donc identique à celui de AGNERAY et coll

5° - Elution du cholestérol

1) Estérifié

KEER et BAULD (40), HENLY (33) sont les seuls à éluer le cholestérol estérifié par l'éther de pétrole sans lui ajouter un autre solvant. Or nous avons signalé la faible solubilité du cholestérol, même estérifié dans ce solvant et en se reportant aux données de TRAPPE (P. 14) on constate que l'alumine ne lâche pas facilement les esters à l'éther de pétrole.

C'est pourquoi dans toutes les autres méthodes un meilleur solvant des esters est ajouté, choisi dans la série éluotrope. Le point délicat est de trouver la quantité de ce solvant qui tout en facilitant l'élution des esters, n'entraîne pas celle du cholestérol libre.

Le tétrachlorure de carbone, que TRAPPE a utilisé seul, sert à HOUGER et BOUTOU (37) pour améliorer la dissolution des esters dans l'éther de pétrole.

2) Libre

L'éther de pétrole contenant une proportion élevée d'éther éthylique (73) ou une certaine quantité d'alcool (35) constitue l'éluant du cholestérol dans deux méthodes. Mais c'est le benzène et le chloroforme, excellents solvants, que la plupart des auteurs préfèrent.

Les quantités de solvants nécessaires pour extraire les esters d'une part, le cholestérol libre d'autre part, ont été indiquées par chaque auteur de même que la vitesse d'écoulement de ces solvants pour assurer un entraînement complet. Les conditions opératoires doivent évidemment être respectées dans l'utilisation de chacune des techniques.

6° - Dosage colorimétrique

Nous ne nous y arrêterons que pour remarquer l'égale faveur dont jouissent la réaction de TSCHUGAEFF et celle de LIEBERMANN-BURCHARD.

Seuls AGNERAY, PUISIEUX et WEPIERRE utilisent la réaction au pe-chlorure de fer.

(°) Il faut lire 20.995 comme nous le dirons p. 22)

III - TECHNIQUE PERSONNELLE D'ADSORPTION SUR ALUMINE

Notre but a été de réaliser une méthode rapide n'exigeant pas, en particulier, le montage d'une colonne à chromatographie. Nous avons essayé de substituer à la chromatographie proprement dite une simple adsorption sur alumine, en tube à centrifuger. C'est-à-dire que nous avons fait appel à la différence d'adsorption entre le cholestérol et ses esters que TRAPPE a signalée, et que nous avons rapportée p. 13.

Avant nous, d'ailleurs, KEUNING et coll (41) avaient proposé une simple adsorption pour rechercher les meilleures conditions d'une chromatographie sur colonne, tant au point de vue adsorbants que éluants.

Nous nous sommes inspirée des méthodes de chromatographie que nous avons exposées pour choisir nos conditions et notre matériel d'expérimentation.

A - Conditions et matériel d'expérimentation

1° - Nature des esters servant d'étalon

Les esters de cholestéryle utilisés par les auteurs précédemment cités sont le stéarate et le palmitate.

Nous avons donc préparé deux solutions étalon dans le chloroforme contenant l'une du stéarate, l'autre du palmitate en concentrations telles que le taux de cholestérol corresponde à 0,6 g p. 1.000, c'est-à-dire identique à celui de la solution de cholestérol libre utilisée dans la méthode de GRIGAUT (soit 1,014 g de stéarate et 0,958 g de palmitate).

2° - Quantités de cholestérol mises en oeuvre.

Désirant établir une microméthode, nous avons calculé approximativement les taux de cholestérol libre et estérifié dans 0,2 ml de sérum normal. La correspondance est obtenue avec 0,5 ml d'une solution d'ester précédemment décrite (soit 0,3 mg en cholestérol) et 0,2 ml de solution de cholestérol libre (soit 0,12 mg). Ces quantités sont augmentées quand nous voulons nous placer dans le cas d'hypercholestérolémies.

3° - Nature de l'alumine

Toute notre expérimentation a été menée sur un échantillon n° 1 d'alumine Prolabo 20 995 que nous possédions à l'époque de nos essais.

Ultérieurement, comme nous le verrons plus tard, nous avons comparé les résultats obtenus sur cette alumine à ceux fournis dans les mêmes conditions par l'alumine standardisée Merck et un autre échantillon n°2 d'alumine Prolabo.

4° - Solvants

Nous en avons essayé plusieurs au cours de notre expérimentation.

5° - Dosage colorimétrique

Nous avons terminé tous nos dosages par une réaction de LIEBERMANN-BURCHARD classique. L'extrait final est repris par 5 ml de chloroforme puis sont ajoutés successivement l'anhydride acétique (2 ml) l'acide sulfurique (5 gouttes). La coloration se développe à l'obscurité à température ambiante pendant 25 minutes exactement.

La lecture est faite au spectrophotomètre JEAN et CONSTANT à 640 mμ. Nous n'ignorons pas les critiques adressées à la lecture en lumière rouge, où il n'y a pratiquement pas de palier de coloration. Mais l'avantage de cette lecture en lumière rouge sur celle effectuée en lumière verte est une augmentation notable de la sensibilité. C'est ainsi que pour une prise d'essai de 120 μg de cholestérol nous obtenons une déviation du spot de 12 divisions dans le rouge, alors qu'elle est seulement de 3, 5 divisions dans le vert.

Dans ces conditions expérimentales, une solution de cholestérol libre et une solution de stéarate correspondant à une même concentration en cholestérol ne donnent pas de colorations d'égale intensité. La densité optique est 10 à 15 % plus faible dans le cas des esters.

En raison de cette différence entre le cholestérol et ses esters et en raison aussi du choix de la lumière rouge pour la lecture, nous ne sommes jamais rapportée à une courbe étalon établie une fois pour toutes mais toujours à des témoins de même nature que le produit essayé, préparés dans les mêmes conditions au moment même.

6° - Méthode de référence pour le dosage des esters de cholestéryle.

Nous avons choisi comme méthode de référence la méthode de HARLAY figurant dans les Fiches techniques de FLEURY (26) parce que nous en avons une grande habitude et nous avons apprécié sa fidélité. Il est bien entendu nécessaire de s'entraîner à son exécution ; les critiques

qui lui ont été faites (17) doivent être attribuées, semble-t-il, aux difficultés des méthodes de précipitation du cholestérol par le digitonoside, qui sont très délicates.

Nous en rappelons le mode d'exécution :

Les lipides et le cholestérol de 5 ml de sérum sont extraits comme dans la technique de GRIGAUT par de l'alcool sodé (30 ml) et de l'éther éthylique (37, 5 ml). On effectue un lavage par 25 ml d'éther de pétrole. Les solvants étherés sont réunis et évaporés à sec. L'extrait est repris par 10 ml de chloroforme. 4 ml de cette solution chloroformique correspondant à 2 ml de sérum servent au dosage du cholestérol total, tandis que 4 ml sont introduits dans un bécher, ainsi que 1 ml d'une solution acétique de digitonoside à 3 % et 5 ml d'alcool éthylique à 90°. Le mélange est mis au bain-marie bouillant pendant 5 minutes en recouvrant le bécher d'un verre de montre pour éviter l'évaporation. Après ce temps, on évapore à sec.

Le nouveau résidu obtenu est épuisé par 30 ml d'éther de pétrole chaud qui extrait uniquement le cholestérol estérifié, le digitonide étant insoluble dans ce milieu. Cet épuisement s'effectue par fraction de 5 ml d'éther de pétrole, suivi d'une filtration. L'éther de pétrole est évaporé à sec, et sur le résidu on effectue une réaction classique de LIEBERMANN-BURCHARD précédemment décrite.

La méthode de HARLAY appliquée à des quantités connues d'ester de cholestérol nous a toujours donné de bons résultats. Nous avons fait, par exemple, sur une prise d'essai de stéarate de cholestérol correspondant à 4 mg de cholestérol, 9 déterminations, elles nous ont donné respectivement : 3,89 - 3,89 - 3,90 - 3,90 - 3,90 - 4 - 4 - 4 - 4.

La méthode est de plus fidèle comme le montrent les résultats précédents et des chiffres obtenus dans des dosages de cholestérol estérifié sérique faits en double :

1,98 - 1,88	1,44 - 1,45	1,36 - 1,35	1,43 - 1,47
1,53 - 1,51	1,61 - 1,63	1,32 - 1,31	1,68 - 1,71
1,24 - 1,26	1,49 - 1,44		

B - Essais de récupération totale des esters du cholestérol.

Le résidu d'évaporation d'une prise d'essai convenable de solution chloroformique de palmitate, de stéarate de cholestéryle ou de cholestérol libre est repris par 4 ml d'éther de pétrole (type Chemin de Fer).

Cette solution dans l'éther de pétrole est versée sur de l'alumine Prolabo 20.995 (n°1) placée dans un tube à centrifuger à fond rond, d'une capacité de 30 ml. Le mélange est tritué avec un agitateur, puis centrifugé. L'éther de pétrole surnageant est décanté et recueilli dans un petit vase de 25 ml bouché émeri. L'alumine est triturée 2 fois avec 5 ml d'éther de pétrole, et chaque fois le mélange est centrifugé. Les différentes solutions éthérées sont réunies puis évaporées. Le résidu repris par du chloroforme est soumis à la réaction de LIEBERMANN-BRUCHARD.

1°) - Choix de la quantité d'alumine à utiliser.

Nous avons fait varier la quantité d'alumine de 0,3 à 2 g pour une même quantité de cholestérol (0,3 mg) apportée sous forme de cholestérol libre ou d'ester.

Quantité de cholestérol récupéré en mg, sur les 0,3 ml mis en oeuvre

Poids d'alumine en g	0,3	0,7	1	1,2	1,5	2
Palmitate de cholestéryle	0,30	0,305	0,28		0,26	
Stéarate de cholestéryle	0,30			0,305	0,32	0,28
Cholestérol libre	0,044	0,036	0,014		0,019	

Il apparait que si les esters sont récupérés totalement ou presque, le cholestérol libre est lui-même récupéré en quantité notable (14,7 et 12 % quand la quantité d'alumine est seulement de 0,3 à 0,7 g).

Pour mieux apprécier l'erreur éventuelle qu'apporterait le cholestérol libre à un dosage de cholestérol estérifié basé sur ce procédé, nous avons soumis à l'adsorption sur l'alumine un mélange d'ester (palmitate) et de cholestérol libre dans les proportions relatives existant dans 0,2 ml de sérum normal soit 0,3 mg sous forme d'ester, 0,1 mg sous forme de cholestérol.

Voici les résultats obtenus en fonction de la quantité d'alumine utilisée :

Alumine en g	: 0,3	0,7	1	1,5
Cholestérol récupéré en mg	: 0,379	0,328	0,316	0,30

Il découle de ces expériences que les quantités de 0,3 et 0,7 g d'alumine sont insuffisantes pour retenir tout le cholestérol libre. L'erreur apportée est considérable avec 0,3 g d'alumine puisqu'on retrouve 0,379 mg de cholestérol et qu'il n'y a que 0,300 mg de cholestérol estérifié !

Au contraire en présence de 1 g ou 1,50 g d'alumine, les chiffres peuvent être considérés comme exacts. Cependant, il y a sans doute là une certaine compensation entre une insuffisance d'extraction des esters (d'après nos résultats de la p. 26) et le passage d'une petite quantité de cholestérol libre.

Cette compensation donne dans la plupart des cas l'illusion d'une exactitude comme le prouvent les résultats obtenus sur des sérums :

Rapport cholestérol estérifié / cholestérol total (en pourcentage) dans 13 sérums.

Méthode de HARLAY	Méthode personnelle	Ecart %
71	61	- 14
64,5	58,2	- 9,7
65,5	59,3	- 9,4
69	64,2	- 6,9
64	60,7	- 5,1
64,8	61,9	- 4,4
61	59	- 3,2
72	70	- 2,7
59,1	59	- 0,2
63	63	0
66	67	+ 1,5
61	62	+ 1,6
58	62	+ 6,8

Bien que cette méthode ne nous apportât pas pleine satisfaction, nous avons tenté une amélioration portant sur la reprise du cholestérol (libre ou estérifié) avant de la soumettre à l'adsorption sur alumine.

Nous avons imité un certain nombre d'auteurs (tableau page 20) en adoptant l'éther de pétrole. Mais nous avons signalé le peu de solubilité du cholestérol et nous avons eu de grandes difficultés à récupérer en totalité le cholestérol à l'aide de ce solvant. C'est pourquoi, nous avons adopté la méthode d'AGNERAY et coll. (1) (2) où une petite quantité de chloroforme assure rapidement la dissolution, et nous avons repris les expériences précédentes.

2°) - Adsorption du cholestérol estérifié en solution dans l'éther de pétrole additionné de chloroforme.

Nous avons dissous le résidu d'évaporation de 1 ml des solutions chloroformiques de palmitate et de stéarate de cholestéryle dans 0,2 ml de chloroforme. Nous avons ajouté alors 4 ml d'éther de pétrole puis rincé la capsule avec 1 ml. La solution (5,2 ml) est versée sur l'alumine, triturée puis décantée après centrifugation. L'alumine est triturée par 6 puis 5 ml d'éther de pétrole. Ces deux liquides d'épuisement sont réunis à la solution primitive (extractum 1). Deux lavages ultérieurs avec 5 ml de chloroforme constituent l'extractum 2. Enfin, deux lavages avec 6 ml de chloroforme fournissent l'extractum 3. Le cholestérol est dosé dans chacun de ces extraits.

Nos résultats sont rassemblés dans le tableau suivant :

Quantités de cholestérol exprimées en mg, récupérées dans 3 extractions successives de l'alumine après adsorption de 0,6 mg de cholestérol sous forme d'esters.

Alumine en g	Expérience I				Expérience II				Expérience III				
	0, 3	0, 7	1	1, 5	0, 3	0, 7	1	1, 5	0, 3	0, 5	0, 7	0, 9	1
Nature du cholestérol Stéarate. ----- Extractum 1 (Ether de pétrole)	0, 58	0, 52	0, 518	0, 43	0, 58	0, 56	0, 51	0, 44	0, 52	0, 53	0, 56	0, 46	0, 06
Extractum 2 (chloroforme)	0, 01	0, 05	0, 05	0, 10	0	0	0	0	0	0, 02	0, 02	0, 04	0, 05
Extractum 3 (chloroforme)	0	0, 01	0, 04	0, 03	0	0, 03	0, 05	0, 10	0	0, 02	0, 02	0, 04	0, 05
TOTAL	0, 59	0, 58	0, 60	0, 56	0, 58	0, 59	0, 56	0, 54	0, 52	0, 58	0, 60	0, 54	0, 54
Palmitate ----- Extractum 1 (Ether de pétrole)	0, 54	0, 51	0, 48	0, 44	0, 53	0, 51	0, 48	0, 41					
Extractum 2 (Chloroforme)	0	0	0, 02	0, 04	0	0, 02	0, 03	0, 05					
Extractum 3 (Chloroforme)	0, 06	0, 09	0, 10	0, 17	0, 04	0, 06	0, 10	0, 14					
TOTAL	0, 60	0, 60	0, 60	0, 65	0, 57	0, 59	0, 61	0, 60					

Nous nous attendions à une récupération beaucoup plus aisée des esters que dans nos expériences précédentes, en raison de la présence du chloroforme dans la solution soumise à l'adsorption. Les résultats obtenus traduisent au contraire une fixation plus intense, puisque dans presque tous les essais le chloroforme est nécessaire pour extraire de l'alumine une partie non négligeable de cholestérol qui a résisté aux extractions par l'éther de pétrole.

Nous avons pensé à améliorer cette récupération en utilisant pour le lavage de l'alumine non pas l'éther de pétrole seul mais l'éther de pétrole additionné de 10 % de chloroforme (2 fois 5 ml), comme AGNERAY et ses collaborateurs (1) (2).

De fait, le cholestérol est totalement récupéré par ces deux lavages. Deux lavages supplémentaires se montrent inutiles, de même l'ultime lavage au chloroforme.

3° - Comportement du cholestérol libre en utilisant les solvants d'AGNERAY.

Il était intéressant de connaître comment se comportait le cholestérol non estérifié en utilisant les solvants d'AGNERAY et coll(CHCl_3 + Ether de pétrole).

Des quantités de cholestérol variant de 0,12 à 0,36 mg sont reprises par 0,2 ml de chloroforme auquel on ajoute ensuite 4 ml d'éther de pétrole ; 1 ml d'éther de pétrole sert au rinçage, c'est donc sous un volume de 5,2 ml, comme ci-dessus, que le cholestérol est mis en contact avec l'alumine. Nous avons pris 0,7 g d'alumine, puisque AGNERAY et coll. ont montré qu'elle convenait dans leurs essais.

Après trituration et centrifugation, l'alumine est lavée quatre fois par 5 ml du mélange : Ether de pétrole 9 ml + chloroforme 1 ml.

Ces quatre solutions de lavage sont ajoutées à la solution primitive récupérée par centrifugation (extractum 1).

Deux lavages avec 5 ml chacun de chloroforme constituent l'extractum 2. Le cholestérol est dosé dans chaque extractum. Les résultats obtenus figurent dans le tableau suivant :

Quantité de cholestérol libre exprimée en mg, récupérée après adsorption sur 0,7 g d'alumine, par emploi successif d'éther de pétrole + chloroforme (extractum 1) et de chloroforme (extractum 2).

Cholestérol en mg, soumis à l'adsorption	0,12	0,24	0,36
Cholestérol récupéré Extractum 1 (Ether de pétrole-chloroforme)	0,06	0,15	0,24
Extractum 2 (Chloroforme)	0,03	0,04	0
Total	0,09	0,19	0,24
Pourcentage de récupération	75	76	66

Nous voyons que le cholestérol n'a pas été récupéré en totalité mais que l'extraction par l'éther de pétrole + chloroforme est relativement importante. Par conséquent, le lavage de l'alumine par le mélange éther de pétrole - chloroforme qui facilitait la récupération des esters facilite malheureusement aussi la dissolution du cholestérol libre.

La substitution du solvant d'AGNERAY et coll. à l'éther de pétrole pour laver l'alumine a donc rendu plus mauvais nos essais de séparation du cholestérol libre et du cholestérol estérifié.

Arrivée à ce point de notre expérimentation, nous nous sommes demandé si le fait de réunir la solution soumise à l'adsorption et récupérée après la première centrifugation, avec les lavages ultérieurs de l'alumine n'était pas reponsable de la présence du cholestérol libre en proportion aussi importante dans ce premier extractum.

AGNERAY et PUISIEUX (3) avaient signalé incidemment que dans leur technique de chromatographie "les esters ne sont pas nécessairement fixés en totalité sur la colonne, c'est pourquoi le liquide de fixation et l'éluant éther de pétrole-chloroforme doivent être recueillis dans la même capsule".

Autrement dit, lors du contact de la solution d'esters avec l'alumine, une fraction de ces esters n'est pas fixée.

Etant donnée la forte adsorption du cholestérol libre, il nous a paru vraisemblable que, dans nos conditions expérimentales, le cholestérol libre, au contraire, était totalement fixé et sa récupération devait être due aux lavages ultérieurs.

Nous avons donc procédé à des adsorptions sur alumine comme précédemment mais en prenant soin de recueillir séparément le solvant d'adsorption après centrifugation de l'alumine et les lavages faits avec le mélange éther de pétrole - chloroforme.

4° - Analyse de la solution de cholestérol libre et estérifié après
adsorption sur alumine et analyse des solvants servant au lavage
de l'alumine.

Nous avons mené ensemble 3 expériences portant respectivement sur 0,12 mg de cholestérol libre, sur l'équivalent de 0,30 mg en cholestérol en palmitate et sur leur mélange.

La quantité d'alumine est 0,7 g

Les solvant sont ceux de AGNERAY et coll, soit 5 ml d'éther de pétrole + 0,2 ml de chloroforme pour la mise en solution du cholestérol pour la mise en solution du cholestérol (liquide d'adsorption), tandis que les lavages consistent dans deux triturations successives de l'alumine avec 5 ml du mélange : 9 ml éther de pétrole + 1 ml chloroforme.

Nous nous sommes assurée dans un essai préliminaire que le temps de contact lors de la trituration de l'alumine avec la solution de cholestérol ne changeait pas le résultat : nous avons en effet obtenu le même chiffre après un contact de 2 à 3 minutes - 15 minutes - 30 minutes.

Nous n'avons donc jamais précisé la durée de ce contact qui dépend du nombre d'analyses exécutées simultanément.

Voici les résultats de ce premier essai :

Nature et quantité de Cholestérol soumis à l'adsorption	Cholestérol récupéré en mg dans	
	<u>liquide d'adsorption</u>	<u>liquide de lavage</u>
Cholestérol libre 0,12mg	0,015	0,040
Palmitate de cholestéryle 0,30mg	0,180	0,080
Mélange		
Cholestérol 0,12mg	0,190	0,100
Palmitate 0,30mg		

Il apparaît nettement que le cholestérol libre est en quantité plus élevée dans les lavages que dans le liquide d'adsorption. Par contre, l'ester se trouve en plus grande quantité dans le liquide d'adsorption que dans les lavages ; il échappe donc pour une part importante à l'adsorption.

Nous nous sommes demandé si la petite quantité de cholestérol libre restant dans le liquide d'adsorption augmentait ou non avec la quantité mise en jeu. La même expérience reprise sur une prise d'essai de cholestérol libre, triple de la précédente, soit 0,36 mg, a montré que 0,020 mg de cholestérol n'est pas absorbé : le cholestérol libre non adsorbé dans ces expériences nous apparaît donc comme relativement fixe et indépendant de la prise d'essai.

C - Cholestérol estérifié échappant à l'adsorption sur alumine

La quantité importante de cholestérol estérifié retrouvée dans la solution après trituration avec l'alumine nous a incitée à poursuivre l'expérience sur des quantités variables d'esters de cholestérol.

Nous avons employé 0,7 g d'alumine Prolabo 20 995 (échantillon n°1) comme précédemment et la technique est la même. Les quantités utilisées d'esters correspondent à un taux de cholestérol allant de 1,50 g à 9 g par litre de sérum.

Quantité de cholestérol mise en jeu en mg	Quantité de cholestérol en mg dans (1° - <u>Solution de stéarate</u>)		Pourcentage de cholestérol non adsorbé.
	Liquide d'adsorption	Lavages	
0,3	0,19	0,09	63,3
0,6	0,38	0,20	63,3
0,9	0,59	0,27	65,5
1,2	0,75	0,35	62,5
1,8	1,10		61
(2° - <u>Solution de palmitate</u>)			
0,3	0,19	0,08	63,3
0,6	0,36	0,20	60
0,9	0,59	0,28	65,5
1,2	0,78	0,36	65

Donc, pratiquement, une fraction constante d'ester de cholestéryle, voisine de 2/3 dans les conditions indiquées, échappe à la fixation.

Ces résultats nous ont amenée à étudier l'influence de la quantité d'alumine mise en jeu, du volume de solution de cholestérol soumis à l'adsorption, de la nature des solvants.

1°) Influence de la quantité d'alumine

Nous avons soumis à l'adsorption sur des quantités variables d'alumine, une quantité fixe de stéarate de cholestéryle (correspondant à 0,6 mg de cholestérol) dissoute dans 0,2 ml CHCl_3 + 5 ml éther de pétrole.

Quantité de cholestérol non absorbé sur les 0,6 mg soumis à l'essai.

Alumine en g	0,3	0,7	1	1,5
Cholestérol non adsorbé :				
en mg	0,45	0,39	0,31	0,23
en %	75	65	56,6	38,3

La quantité de cholestérol échappant à la fixation sur alumine dépend donc de la quantité d'alumine utilisée.

Du cholestérol non estérifié est soumis à la même expérience :

Quantité de cholestérol libre exprimé en mg non adsorbé.

Cholestérol libre soumis à l'essai en mg.	Alumine en grammes			
	0,3	0,7	1	1,5
0,12	0,015	0,01	0	0
0,36	0,02	0,01	0	0

Cette expérience confirme notre premier essai signalé p. 33 : le cholestérol libre intervient de façon négligeable dans le dosage du cholestérol estérifié pratiqué sur la solution après contact avec l'alumine.

2°) Influence du volume de solution soumis à l'adsorption

Une même quantité de stéarate de cholestéryle (= 0,6 mg en cholestérol) dissoute dans 0,2 ml de chloroforme est amenée à 3 dilutions différentes en ajoutant des volumes croissants d'éther de pétrole 2,5 - 5 - 8 ml.

La totalité de chacune des solutions soit 2,7 - 5,2 - 8,2 ml est triturée avec 0,7 g d'alumine, le cholestérol est dosé après centrifugation dans le liquide surnageant.

Quantité de cholestérol non adsorbé sur les 0,6 mg soumis aux essais.

Volume de solution mis au contact de 0,7 g d'alumine	2,7	5,2	8,2
Cholestérol non adsorbé en mg en %	0,30 50	0,41 68,3	0,45 75

La quantité de cholestérol non adsorbé augmente lorsque le volume de solution augmente.

Il résulte de ces expériences successives que la quantité de cholestérol estérifié non adsorbé sur alumine dépend du poids d'alumine utilisée, du volume de solution soumise à l'adsorption, mais non de la quantité de cholestérol estérifiée mise en jeu dans les limites expérimentales que nous avons fixées, limites correspondant aux taux de cholestérol estérifié qu'on peut rencontrer dans le sérum sanguin.

Autrement dit, dans des conditions déterminées de poids d'adsorbant, de volume de solution, le pourcentage de cholestérol estérifié non adsorbé paraît relativement constant.

3°) Influence de la nature du solvant

Nous avons exposé précédemment (p. 12) avec quelques détails les expériences de TRAPPE établissant une série éluotrope de solvants.

Il était intéressant de rechercher dans les conditions de notre technique, comment variait l'adsorption du cholestérol en fonction de la nature du solvant. Etant donnée la difficulté de dissolution du cholestérol par l'éther de pétrole seul, nous avons pensé qu'il fallait comparer les solvants après dissolution du cholestérol dans 0,2 ml de chloroforme comme nous l'avons fait précédemment (suivant les indications d'AGNERAY et coll). Nous diluons donc 0,2 ml de chloroforme contenant 0,6 mg de stéarate de cholestéryle par 5 ml de chacun des solvants : éther de pétrole, tétrachlorure, de carbone, trichloréthylène, éther éthylique. Ce sont ces solutions qui sont soumises à l'adsorption.

Quantité de cholestérol, exprimé en mg, non adsorbé sur les
0,6 mg soumis aux essais.

Solvant	Ether de pétrole	Tétrachloru- re de carbone	Trichlor- éthylène	Ether éthy- lique
Cholestérol non adsorbé en mg	0,42	0,47	0,53	0,47
en %	70	78	88	78

Les solvants sont inscrits dans ce tableau dans l'ordre d'activité croissante d'élution (voir p. 13). Il n'est donc pas surprenant de voir monter le pourcentage de cholestérol non adsorbé.

Théoriquement il devrait rester davantage de cholestérol en présence d'éther ; nous retrouvons sans doute l'exception sur laquelle TRAPPE avait attiré l'attention (voir p. 13) elle concernait alors le cholestérol libre.

Dans notre cas, les résultats concernant le cholestérol non estérifié sont résumés dans le tableau suivant :

Quantité de cholestérol libre exprimée en mg non adsorbée sur
les 0,12 mg soumis aux essais.

Solvant	Tétrachlorure de carbone	Trichlor- éthylène	Ether éthylique
Cholestérol en mg	0,015	0,03	0,09

Les quantités de cholestérol libre non adsorbées suivraient donc ici l'ordre d'élution croissant des solvants.

Nous n'avons pas essayé de poursuivre ces essais qui n'apportaient pas d'avantages sur notre technique courante, d'autant plus que le cholestérol libre restait en quantité plus importante dans l'éther et le trichloréthylène que dans l'éther de pétrole.

D - Emploi de diverses alumines et d'autres adsorbants.

1° - ALUMINES

La plupart des auteurs (tableau p.20) ont utilisé l'alumine standardisée suivant BROCKMANN (Merck). AGNERAY et coll. se servent comme nous d'une alumine Prolabo (°) 20 995 . Nous avons voulu savoir si les résultats obtenus sur alumine Prolabo 20 995 (échantillon n° 1 datant de plusieurs années) seraient notablement différents en utilisant un échantillon récent (n° 2) d'alumine Prolabo et une alumine Merck.

a) Caractéristiques des alumines essayées.

Les alumines commerciales ne portent aucune caractéristique. Il nous a donc paru indispensable pour les comparer entre elles d'en déterminer au moins deux caractères qui jouent dans leur pouvoir d'adsorption (voir p.12).

Ce sont :

- l'humidité
- le poids d'une "unité de volume"

Pour cette dernière détermination, nous avons suivi les indications de TRAPPE (84) qui compare les poids d'adsorbants occupant un volume de 1 ml après centrifugation à 3.000 tours/minute, dans un rayon de 15 cm environ. Cet auteur constate ainsi que 1 ml de deux alumines ne différant entre elles que par la ténuité des grains pesait respectivement 0,79 g et 0,17 g

Voic nos résultats :

Alumines	Prolabo 20 995		Merck
	n° 1	n° 2	
Humidité %	3,1	2,9	0,42
Poids en g de ml	1,011	0,840	0,982

En nous reportant aux indications de HESSE et coll (36) que nous avons rapportées page 21 nous voyons que l'alumine commerciale Merck est bien l'alumine d'activité I et que les deux alumines Prolabo ont une activité II.

(°) Dans toutes les publications de AGNERAY et coll. figure par erreur la référence 22.995, qui n'existe pas aux usines Prolabo.

Donc en utilisant l'alumine Prolabo 20 995 nous étions dans les mêmes conditions que la plupart des auteurs (tableau p 20).

Quant au poids de 1 ml d'alumine, nous pensons qu'ils sont en rapport avec la finesse des grains, abstraction faite d'autres éléments que nous ignorons.

b) Adsorption comparée du cholestérol estérifié (stéarate) sur l'alumine Prolabo 20 995 (n°2) et l'alumine Merck.

Nous avons fait 3 séries d'expériences dans lesquelles ont varié successivement :

- la quantité de cholestérol mise en oeuvre.
- la quantité d'alumine.
- le volume de solvant (éther de pétrole 5 ml + chloroforme 0,2 ml.

1ère expérience : quantité variable de cholestérol (stéarate).

poids d'alumine constant (0,7 g)

volume de solvant constant (5,2 ml)

Quantité de cholestérol (stéarate) non adsorbée exprimée en cholestérol.

Cholestérol (stéarate) mis en oeuvre en mg	0,3		0,6		0,9		1,2	
Alumines	en mg	%	en mg	%	en mg	%	en mg	%
Prolabo 20 995 (n°2)	0,28	93,3	0,50	83,3	0,74	82,2	1	83,3
Merck	0,12	40	0,27	45	0,40	44,4	0,58	48,3

Le pourcentage de cholestérol (stéarate) non adsorbé est du même ordre de grandeur, quel que soit le poids de cholestérol mis en oeuvre, mais ce pourcentage varie avec le type d'alumine utilisée.

L'alumine Prolabo 20 995 (n° 2) est moins active que l'alumine 20 995 (n°1) que nous avons utilisée auparavant (p.26) : par contre l'alumine Merck est plus active, ce qui n'est pas pour nous surprendre puisqu'il s'agit d'une alumine d'activité I.

2ème expérience : poids variable d'alumine

quantité constante de cholestérol (0,6 mg) sous forme de stéarate.

volume de solvant constant (5,2 ml).

Quantité de cholestérol (stéarate) non adsorbée exprimée en cholestérol.

Alumine en g	0,3		0,5		0,7		0,9	
Alumines Prolabo 20 995 (n°2)	en mg	%	en mg	%	en mg	%	en mg	%
	0,50	83,3	0,47	78,3	0,43	71,6	0,34	56,6
Merck	0,39	65	0,28	46,6	0,23	38,2	0,16	26,6

Nous voyons (comme pour l'alumine 20 995 n° 1) croître l'adsorption du stéarate quand la quantité d'alumine augmente.

3ème expérience : volume variable de solvant

quantité constante de cholestérol (0,6 mg) sous forme de stéarate.

poids constant d'alumine (0,7 g).

Quantité de cholestérol (stéarate) non adsorbée exprimée en cholestérol.

Volume de solvant	2,2		10,2	
Alumines Prolabo 20 995 (n° 2)	en mg	%	en mg	%
	0,33	55	0,45	75
Merck	0,17	28,3	0,25	41,6

Ces résultats confirment l'importance du volume de solvant dans le pourcentage de non adsorption des esters de cholestérol que nous avons déjà mis en évidence avec l'alumine 20 995 n°1 (p. 36).

2° - AUTRES ADSORBANTS

On peut grouper les adsorbants en 3 catégories suivant leur activité (VELLUZ) (90) :

- 1 - Très actifs : charbon activé - terres diverses - silice
- 2 - Actifs : alumine calcinée - magnésie - silicate acide de magnésium - silicate de calcium hydraté.
- 3 - Faibles : a) minéraux : chaux éteinte - carbonate de calcium - sulfate de calcium - talc - terres d'infusoires - phosphate tricalcique.
b) organiques : sucres.

Nous avons choisi pour nos essais la magnésie, le carbonate de calcium et le lactose.

a) Comparaison de la magnésie, du carbonate de calcium, du lactose

Nous avons trituré avec 0,7 g de chacune de ces substances 5,2 ml de solution habituelle de stéarate de cholestéryle (= 0,6 mg en cholestérol) ou de solution de cholestérol libre (0,12 mg) dans les mêmes conditions qu'avec l'alumine.

Le dosage du cholestérol, dans la solution surnageante après centrifugation, a donné les résultats suivants :

Quantité de cholestérol non adsorbé.

Nature du cholestérol mis en oeuvre	Stéarate (=0,6 mg)		Cholestérol libre (0,12 mg)	
Magnésie	en mg	%	en mg	%
	0,35	58,3	0,07	58
CO ₃ Ca	en mg	%	en mg	%
	0,40	66,6	0,03	25
Lactose	en mg	%	en mg	%
	0,31	51,6	0,04	33

Si la magnésie (qui est classée parmi les adsorbants actifs) retient effectivement plus de cholestérol que la carbonate de calcium, classé comme un adsorbant faible, par contre le lactose semble posséder une capacité d'adsorption élevée vis-à-vis du cholestérol. Nous n'avons trouvé dans la littérature aucune expérience qui nous permette de juger de ce comportement mais le fait nous paraît intéressant.

La quantité de cholestérol libre non adsorbé est importante et semble, du moins dans les conditions indiquées, rendre impossible une séparation du cholestérol de ses esters, sur ces adsorbants.

b) Adsorption du cholestérol estérifié (stéarate) sur CO_3Ca dans différentes conditions.

Nous avons répété avec le carbonate de calcium les 3 séries d'expériences décrites pour les alumines en faisant varier successivement les quantités de cholestérol, d'adsorbant, de solvant.

Quantité de cholestérol non adsorbé en fonction de la quantité de cholestérol mise en oeuvre (poids du CO_3Ca = 0,7 g - Volume du solvant = 5,2 ml.)				
Cholestérol (stéarate) mis en oeuvre en mg	0,3	0,6	0,9	1,2
Cholestérol non adsorbé en mg	0,22	0,43	0,60	48,3
en %	73,3	71,6	66,6	69,1

Quantité de cholestérol non absorbé en fonction de la quantité de CO_3Ca (cholestérol mis en oeuvre = 0,6 mg en cholestérol - Volume de solvant = 5,2 ml)				
CO_3Ca en g	0,3	0,5	0,7	0,9
Cholestérol non adsorbé en mg	0,54	0,49	0,42	0,40
en %	90	81,6	70	66,6

Quantité de cholestérol non adsorbé en fonction du volume de solvant (cholestérol mis en oeuvre = 0,6 mg en cholestérol, poids de CO_3Ca = 0,7 g)		
Volume de solvant	2,2	10,2
Cholestérol non adsorbé en mg	0,29	0,45
en %	48,3	75

D'après ces résultats, l'activité du carbonate de calcium vis-à-vis du stéarate de cholestéryle se rapproche de celle de l'alumine 20 995 (n° 1) plutôt que de l'alumine 20 995 (n° 2).

Son activité vis-à-vis du cholestérol libre paraît au contraire plus faible que celle des alumines.

E - Méthode proposée pour le dosage du cholestérol estérifié dans le sérum sanguin

Les trois alumines que nous avons essayées semblent convenir à la séparation du cholestérol de ses esters, mais ayant étudié avec plus de détails l'alumine Prolabo 20 995 n° 1, c'est cet échantillon que nous avons utilisé pour poursuivre nos essais.

Il restait à prouver que notre technique convient à l'analyse du sérum sanguin.

Pour l'application de notre méthode, nous avons, à la suite des essais relatés précédemment, adopté les conditions suivantes :

L'extraction du sérum se fait par la méthode de GRIGAUT, sur une prise d'essai de 0,2 ml : addition d'alcool sodé (5 ml) puis d'éther (8 ml), lavage à l'éther de pétrole (8 ml).

L'extrait lipidique obtenu après évaporation est redissous dans 0,2 ml de chloroforme, rapidement dilué par 5 ml d'éther de pétrole. Cette solution est triturée dans un tube à centrifuger avec 0,7 g d'alumine. Après centrifugation le liquide surnageant est décanté, évaporé puis soumis à la réaction de LIEBERMANN-BURCHARD.

Nous avons dosé le cholestérol total par la méthode classique de GRIGAUT, le cholestérol estérifié concurremment par la méthode de HARLAY et par notre méthode en admettant le pourcentage d'adsorption trouvé dans les essais préliminaires. Nous avons vu que dans les conditions indiquées ci-dessus (volume de solvant 5,2 ml, poids d'alumine 0,7 g) ce pourcentage était, aux erreurs d'expériences près, égal aux 2/3 de la totalité du cholestérol estérifié. Nous avons donc multiplié les chiffres trouvés dans notre méthode par 3/2.

Voici les résultats obtenus sur 19 sérums.

Cholestérol estérifié en grammes par litre de sérum .

Méthode de HARLAY	Technique personnelle	Ecart %
1,69	1,43	- 15
2,04	1,93	- 5,3
1,46	1,40	- 4,1
1,31	1,26	- 3,8
1,81	1,75	- 3,3
2,06	2	- 2,9
1,62	1,58	- 2,4
1,68	1,65	- 1,7
1,74	1,76	- 1,1
1,72	1,70	- 1,1
1,71	1,72	- 0,5
1,84	1,86	+ 1
2	2,02	+ 1
1,70	1,72	+ 1,1
1,97	2	+ 1,5
1,82	1,85	+ 1,6
1,62	1,65	+ 1,8
1,48	1,51	+ 2
1,30	1,80	+ 38

Sur les 19 sérums examinés, pour 17 d'entre eux, les écarts entre les deux méthodes se trouvent dans les limites de l'erreur expérimentale des dosages du cholestérol. En ce qui concerne les 2 essais où l'écart atteint 15 à 38 %, nous pensons qu'il y a eu de notre part une faute sur l'une ou l'autre méthode, mais opérant sur des sérums humains, qui nous sont donnés en petite quantité, il nous a été impossible de recommencer les dosages.

Nous avons jugé honnête de les faire figurer ici.

En résumé, nous montrons que pratiquement une fraction constante d'esters de cholestérol est fixé sur alumine quand la quantité d'adsorbant et le volume de solution de cholestérol sont constants. Le pourcentage d'adsorption dépend donc de ces conditions. Celles-ci, une fois choisies, entraînent une valeur d'adsorption leur correspondant.

2ème PARTIE

DOSAGE DU CHOLESTEROL PAR LA METHODE

AU CHLORURE FERRIQUE

I - Origine de la réaction

ZLATKIS et ses collaborateurs (95) qui ont été les premiers à préconiser la réaction au chlorure ferrique pour doser le cholestérol n'ont donné aucune indication sur l'origine de cette réaction. Les nombreux auteurs qui ont ultérieurement mis à profit cette même réaction n'ont pas donné plus de précision.

Le mérite de la découverte de cette réaction qui connaît actuellement une telle faveur doit revenir, nous semble-t-il, à Hugo SCHIFF. Cet auteur a proposé deux réactions d'identification du cholestérol, que J. FRECHIN fait d'ailleurs figurer dans sa thèse parmi les nombreuses réactions chimiques actuellement connues (28). Comme cette réaction est tombée dans l'oubli, nous croyons bon de l'exposer.

Voici comment H. SCHIFF décrivait cette réaction en 1860 (72) (Nous traduisons le texte allemand) :

" Si on évapore de la cholestérine avec HCL ou SO_4H_2 contenant du chlorure ferrique, le résidu se colore en un violet magnifique.

J'emploie comme réactif un mélange de 2 à 3 vol. d'HCL ou SO_4H_2 concentré avec 1 vol. d'une solution de chlorure ferrique moyennement dilué, du reste la réaction se produit déjà avec HCL brut courant.

On triture une petite quantité de cholestérine avec une goutte de réactif apportée à l'extrémité d'un agitateur. Le mélange est alors évaporé avec précaution à feu doux. Il se développe d'abord une coloration violette rouge qui passe, à plus haute température, à violet bleu et par chauffage encore plus intense à une coloration indéfinissable.

Si on emploie SO_4H_2 , on doit chauffer avec plus de précaution. Le mélange est d'abord rouge carmin, puis violet et enfin carbonisé. L'avantage est qu'ici ne se dégage aucune vapeur acide et que le résidu se dissout beaucoup plus facilement dans l'eau qu'avec HCL ".

L'auteur avait craint que cette réaction ne soit pas due au cholestérol mais à un reste de pigment biliaire, l'échantillon ayant été obtenu à partir de calculs biliaires. Mais l'expérience lui montra que ce pigment ne participe pas à la coloration violette observée, de même d'autres constituants de la bile (taurine, acide cholalique)...

Outre FeCl_3 , les chlorures d'or et de platine sont capables de fournir cette même réaction colorée ; également, le bichromate de potassium en présence d'HCL.

L'auteur poursuit :

"Comme dans ces réactions la coloration obtenue résulte vraisemblablement d'une oxydation de la cholestérine, j'ai essayé de l'obtenir avec HCL contenant NO_3H ainsi que par HCL après addition de nitrate ou de chlorate de potassium, mais, dans aucun cas, je n'ai obtenu de résidu violet".

Et aujourd'hui, après 100 ans, nous n'en savons pas plus sur cette réaction !

La coloration violette signalée par SCHIFF en présence d'acide chlorhydrique est bien semblable à celle que nous obtenons dans le dosage mais elle vire au violet bleu. En présence d'acide sulfurique, la teinte est plus rouge au début mais vire ensuite à un violet légèrement bleu. Un chauffage plus poussé donne dans les deux cas une teinte sale.

En présence de bichromate de potassium en milieu chlorydrique, on obtient bien la teinte verte signalée, virant ensuite à un violet clair et non bleu. Il nous semble que cette dernière technique pourrait peut être servir aussi à une application quantitative.

II - Utilisation quantitative

A - Méthode de ZLATKIS, ZAK, BOYLE (95)

Dans la méthode de ZLATKIS et coll. la réaction se développe dans le sérum lui-même. On ajoute à 0,1 ml de sérum, 3 ml d'acide acétique et 2 ml de réactif constitué par du chlorure ferrique en solution acétique fortement dilué dans l'acide sulfurique. La coloration pourpre obtenue se prête facilement à un dosage colorimétrique.

Le dosage est donc pratiqué directement sur le sérum ou le plasma.

a) Critiques

Cette technique a suscité des critiques, les résultats trop élevés qui étaient obtenus ont été attribués principalement aux deux premiers éléments perturbateurs que nous indiquons.

1° Le tryptophane est susceptible d'intervenir (82) (89). Il est possible que la présence d'acide glyoxylique (impureté fréquente de l'acide acétique joue un rôle. C'est pourquoi HERRMANN (34) a préconisé une purification

délicate de l'acide acétique (distillation en présence de trioxyde de chrome). Cette purification est évidemment peu compatible avec la nature routinière du dosage.

2° La bilirubine fausse le dosage par excès (33) (82) (5). Mc INTYRE et coll. (53) précisent que 1 mg de bilirubine augmente le taux de cholestérol d'environ 1,4 mg. Dans le cas de sérums ictériques cette erreur peut donc être notable.

3° Un troisième facteur qui ne semble pas avoir beaucoup retenu l'attention, est la présence d'une quantité importante de vitamine A dans le sérum. KINLEY et KRAUSE (43) indiquent que l'addition de 30 µg de vitamine pour 100 ml de sérum entraîne une augmentation de 10 à 15 mg du cholestérol.

Il convenait donc de parfaire la technique de dosage direct.

4° Nous ajouterons comme interférences mal précisées : l'hémolyse et surtout l'urée. BAERTZ et coll. (5) ont constaté que le taux de cholestérol estimé par la réaction de ZLATKIS augmente en fonction du taux d'urée quand celui-ci est supérieur à 1,50 g. Cependant comme l'urée elle-même (pas plus d'ailleurs que l'acide urique et la créatinine) ne donne la réaction, l'auteur pense que l'interférence est due à un produit de déchet.

5° On a fait, à la réaction au chlorure ferrique elle-même, une grave critique en mettant en doute sa spécificité.

En effet, BISCHOFF et TURNER (6) indiquent une réaction positive avec 18 stéroïdes parmi lesquels figure le 7-cholestène-3 β ol qui se trouve avec le cholestérol dans les tissus et les liquides biologiques.

Nous avons d'ailleurs signalé (p. 1) qu'il est très vraisemblable qu'il y a dans le sérum des stéroïdes voisins du cholestérol donnant une réaction de LIEBERMANN positive et même un complexe avec le digitonoside.

La réaction au chlorure ferrique n'est donc, en l'état actuel, de nos connaissances, guère plus critiquable que les autres.

b) Perfectionnement de la méthode

Il ressort des deux premières critiques qu'une élimination des protéines s'impose puisque le tryptophane est un constituant des protéines et que la bilirubine est liée aux protéines.

Deux voies ont été suivies :

a - Extraction des lipides par un solvant organique (qui précipite en même temps les protéines).

b - Précipitation des protéines en milieu aqueux.

La première ne peut remédier qu'à l'élimination du tryptophane car la bilirubine et la vitamine A sont susceptibles de passer dans des solvants organiques. Au contraire, en milieu aqueux, la précipitation des protéines entraîne avec elles la bilirubine et la vitamine A.

B - Etude générale des différentes techniques

La technique de ZLATKIS, ZAK et BOYLE (95) a été reprise par Mc INTYRE (53) qui n'y a apporté que des modifications de détail.

Nous nous arrêterons plus longuement sur les autres méthodes qui, toutes, éliminent les protéines avant le dosage du cholestérol.

Nous avons rassemblé ces méthodes en trois tableaux (p. 50 et 51) afin d'étudier plus aisément les particularités propres à chacune.

1° Quantité de sérum mise en oeuvre

La prise d'essai est variable, en général de l'ordre de 0,1 à 0,4 ml de sérum et le dosage ne porte pas sur plus de 0,1 ml.

La coloration donnée par le chlorure ferrique est suffisamment intense puisque certains auteurs réduisent encore, avec succès, la prise d'essai (0,04 - 0,025 ml).

2° Modes d'élimination des protéines

I) Solvants organiques

L'accord semble être fait sur une bonne extraction lipidique par le mélange alcool-acétone ou alcool-éther.

KLUNGSOYR et coll (45) ont proposé l'extraction du cholestérol par l'alcool et l'acétate d'éthyle, LEFFLER (47) par l'alcool isopropylique.

II) Réactif de précipitation des protéines

Certains auteurs utilisent le chlorure ferrique en solution acétique introduisant ainsi par leur agent de défécation, le réactif du dosage du cholestérol.

DIFFERENTES TECHNIQUES DE LA METHODE DE COLORATION AU CHLORURE FERRIQUE

1) Réaction exécutée directement

AUTEURS	Sérum en ml	Acide acétique	Réactif Solution de FeCl_3 à 10 % dans $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$, diluée à 1/10 dans SO_4H_2	après retour à température ordinaire
ZLATKIS - ZAK - BOYLE (1953) (95)	0,1	3	2	$\lambda = 560 \text{ m}\mu$
Mc INTYRE (1954) RALSTON (53)	0,1	6	4	$\lambda = 570$

2) Réaction exécutée après précipitation des protéines

AUTEURS	Sérum en ml	Précipitation des protéines		Réaction colorée	
		Réactif $\text{FeCl}_3 - \text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$	Mode opératoire	SO_4H_2	Lecture $\lambda = 560$
		% en FeCl_3	ml	en ml	
HENLY (1957) (33)	0,1	0,05	10	3	Après 20-30 mn
ZAK (1957) (94)	0,1	0,084	4	2	Après retour à température ordinaire
CHIAMORI (1959) HENRY (14)	0,1	0,05	9,9 Repos 10-15 mn B. M. à 60° Centrifugation	3	Après 10 mn

3° Solvants de reprise des lipides (quand ils ont été extraits)

Les auteurs utilisent soit l'acide acétique seul à froid soit une solution acétique de chlorure ferrique au bain-marie bouillant.

La difficulté de redissolution du cholestérol dans l'acide acétique a incité AGNERAY et coll. (1) (2) à proposer le mélange chloroforme-acétate d'éthyle.

4° Composition du réactif au chlorure ferrique

ZLATKIS et coll. utilisent une solution acétique de chlorure ferrique diluée par l'acide sulfurique. La composition d'un tel réactif se retrouve dans de nombreuses techniques. On lui reproche de manquer de stabilité. C'est pourquoi, ROSENTHAL et coll. (69) utilisent une solution stock de chlorure ferrique dans l'acide phosphorique qui est dilué, au moment de l'emploi, par l'acide sulfurique. Ce réactif a été adopté par LEFFLER (47) et COURCHAINE (20).

5° Exécution de la réaction

L'adjonction des réactifs s'effectue soit simultanément (ZLATKIS - Mc INTYRE) soit successivement et dans ce dernier cas en prenant soin de former deux couches superposées avant de mélanger.

La lecture - le mélange acide sulfurique - acide acétique entraîne une élévation de température atteignant environ 50°. C'est pourquoi certains effectuent la lecture après retour à la température ordinaire tandis que d'autres précisent un repos de 10 - 20 - 30 ou 60 minutes.

Choix de la longueur d'onde : la coloration est en général lue à 560 m μ , mais KLUNGSSOYR et coll. (45) indiquent 490, COURCHAINE (20) 550, Mc INTYRE et HERRMANN (34) 570, LEFFLER (47) 540 μ .

Gamme de référence - Les auteurs sont d'accord pour dire que la réaction au chlorure ferrique est la même pour le cholestérol libre et estérifié. Seuls AGNERAY et coll. utilisent deux gammes distinctes de cholestérol libre et d'ester de cholestérol.

III - Methode personnelle

Ayant eu l'occasion d'utiliser la réaction au chlorure ferrique suivant l'une ou l'autre méthode parmi celles que nous avons exposées et sans grande satisfaction il nous a paru utile de mettre au point une technique qui réponde au mieux aux critiques ou aux inconvénients relatifs à certaines méthodes en usage.

1° Nous avons vu que la précipitation des protéines par un réactif acide était plus satisfaisante que l'extraction des lipides par un solvant. Nous avons donc fait une précipitation des protéines non par la solution acétique de chlorure ferrique mais plus simplement par l'acide acétique seul.

Nous avons vérifié que la bilirubine était éliminée et n'interférait plus (en pratiquant notre méthode que nous allons exposer). En effet, nous avons analysé 3 sérums par la méthode classique de GRIGAUT et par notre méthode.

Voici les résultats obtenus :

Sérums	<u>Bilirubine</u>	<u>Cholestérol total</u>	
		Méthode de GRIGAUT	Technique proposée
1	200 mg	1,10 g	1,18 g
2	125	1,86	1,90
3	120	2,47	2,59

Les différences observées sont de l'ordre de celles rencontrées dans des sérums normaux.

2° Nous avons utilisé le réactif au chlorure ferrique stable de ROSENTHAL.

3° Nous laissons la coloration se développer à la température de 37° qui assure un développement plus régulier de la coloration.

En outre, nous avons été amenés à bien préciser tous les points de la technique afin de la rendre aisément utilisable. C'est ainsi que nous sommes arrivés à établir un protocole qui a déjà fait l'objet de deux publications en collaboration avec M. PIERFITTE (63) (64).

A - Description de la technique proposée :

1) Principe

Le sérum est déprotéinisé par l'acide acétique à froid : le cholestérol et ses esters restent en solution. Après centrifugation, une partie aliquote de la solution est traitée par un réactif ferrico-sulfurique qui développe une coloration pourpre stable, mesurée au photomètre.

2) Réactifs

a) Acide acétique pur RP pour analyses

Il est nécessaire d'utiliser un acide acétique anhydre ; en effet, la présence de 5 % d'eau empêche la précipitation des protéines. Il faut donc rejeter certains échantillons d'acide acétique s'ils ne donnent pas de précipité avec le sérum, dans les conditions expérimentales proposées. HERRMANN (34) préconise une purification par ébullition à reflux durant trois heures en présence de trioxyde de chrome.

b) Solution stock de chlorure ferrique

$\text{Fe Cl}_3, 6 \text{ H}_2\text{O}$ 2,5 g

PO_4H_3 à 87 % Q. S. 100 ml

Nous avons utilisé le chlorure ferrique cristallisé "pro Analyti" Merck ou le "perchlorure de fer purifié sec" Prolabo à la même concentration sans tenir compte de l'eau de cristallisation, avec des résultats identiques.

On peut substituer au chlorure ferrique, difficile à conserver, un sel stable tel que l'alun de fer et d'ammonium à la dose de 4,460 g pour 100 ml de PO_4H_3 ; mais la coloration qui se développe manque de stabilité. L'addition de 2,4 ml de ClH fumant dans 100 ml de solution ferrique stabilise la coloration développée et la rend propre au dosage.

c) Réactif ferrique

Solution stock (réactif B) 8 ml

SO_4H_2 pur Q. S. 100 ml

Le mélange de ces deux liquides donne un réactif légèrement jaune, stable durant deux mois, qui doit être conservé à la température ordinaire en flacon bouchant à l'émeri de façon à éviter toute fixation d'eau.

d) Solution étalon de cholestérol

Cholestérol pur et sec		0,100 g
Acide acétique pur Q. S.		100 ml

La dissolution se fait facilement par chauffage modéré.

e) Solution standard de cholestérol

Solution étalon de cholestérol (réactif d)	; 5 ml
Acide acétique pur Q. S.	 50 ml

Cette solution est préparée extemporanément. Elle renferme 0,1 mg de cholestérol par ml et sert à la préparation de gammes d'étalonnage ou de témoins.

3) Mode opératoire

a) Déprotéinisation

Dans un tube à centrifuger à fond rond de 30 ml, bien sec, mesurer :

Acide acétique (réactif A) 10 ml

Sérum..... 0,2 ml

Mélanger soigneusement avec un agitateur, les protéines du sérum doivent précipiter si l'échantillon d'acide acétique est correct. Laisser en contact 30 minutes, en agitant de temps en temps. Centrifuger à 5 000 tours par minute durant 5 minutes. Décanté le liquide surnageant dans un tube sec.

Remarques :

1) La réaction colorée s'effectuant en milieu sulfurique, la présence des protéines donne lieu à une légère carbonisation qui fausse les résultats ainsi que le montre le tableau :

		Cholestérol en g p. 1 000					
Sérums n°		1	2	3	4	5	6
Méthode Cl_3Fe :							
avec déprotéinisation		2,60	2,52	2,68	1,96	2,61	1,53
sans déprotéinisation		3,34	3,19	3,38	2,52	3,22	1,95
Méthode de GRIGAUT		2,67	2,53	2,64	1,82	2,62	1,45

2) Nous préconisons un temps de contact de 30 minutes, suffisant pour que tout le cholestérol du sérum passe en solution, ainsi que le montrent les résultats suivants:

Temps de déprotéini- sation en minutes	5	15	30	60	90	120
Cholestérol en g %	1,66	1,70	1,85	1,85	1,85	1,85

3) La centrifugation est préférable à la filtration qui risque de donner un liquide légèrement trouble.

b) Réaction

Prélever avec une pipette sèche 5 ml de liquide décanté. Les placer dans un tube à essais ou dans un erlenmeyer de 50 ml. Ajouter 4 ml de réactif ferrique C en ayant soin de laisser couler ce réactif le long des parois de façon à obtenir deux couches superposées.

Il est avantageux de répartir les réactifs A et C avec une burette.

Mélanger brusquement par agitation (fioles) ou par retournement (tubes).

Remarques :

Il est indispensable de mélanger brusquement le réactif ferrique C avec la solution acétique de cholestérol, la température s'élève ainsi à + 52° C et il apparaît une coloration jaune brun qui passe rapidement au violet pourpre.

Si l'addition du réactif C est faite goutte à goutte, en agitant, le développement de la réaction est incomplet, l'élévation de température étant insuffisante.

Dans nos conditions opératoires, nous avons noté que les tubes doivent rester une heure à 37° pour obtenir un développement maximum de la coloration sur le défécât du sérum. Dans les tubes de la gamme étalon la réaction atteint plus rapidement son maximum, mais la coloration étant stable, il n'y a aucun inconvénient à les laisser le même temps à l'étuve.

c) Lecture

La mesure de la densité optique de la réaction colorée s'effectue en cuves de 1 cm à une longueur d'onde de 560 mμ . Nous utilisons le spectrophotomètre JEAN et CONSTANT ou l'électrophotomètre de MEUNIER

Réaction au Chlorure Ferrique

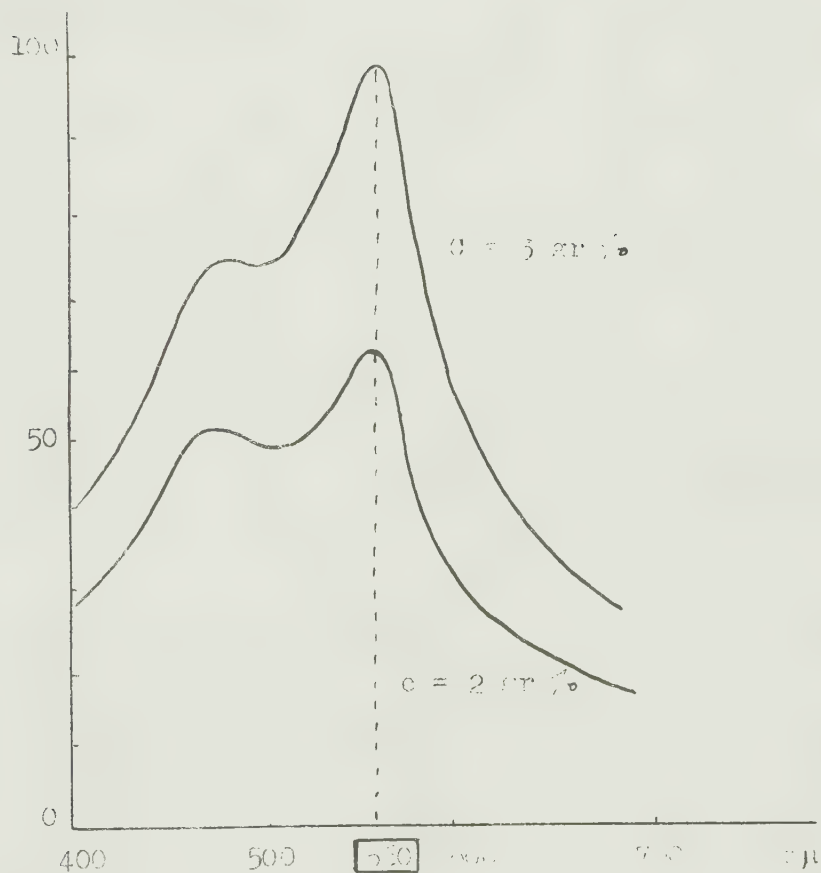
Gamme de référence

Tubes	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Sol. étalon de cholestérol en ml	0	1	1,25	1,50	1,75	2	2,25	2,50	2,75	3	3,50	4	4,5	5
Quantité de cholestérol en g %	0	1	1,25	1,50	1,75	2	2,25	2,50	2,75	3	3,50	4	4,5	5
$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ Q.S. 5ml soit	5	4	3,75	3,50	3,25	3	2	2,50	2,25	2	1,50	1	0,5	0
Réactif colorant en ml	2	2	2	2	2	2	2	2	2,75	2	2	2	2	2
Divisions lues au Spectrophotomètre JEAN et CONSTANT		27,5	34,5	44,5	58	60,5	68,5	80	88	101,5	107,5	123,9	139,5	164

SPECTRE D'ABSORPTION DE LA REACTION COLOREE

En ordonnée : graduations du spectrophotomètre. Cuve de 1 cm

En abscisse : longueur d'onde en $m\mu$.



Gamme étalon (p. 58)

Nous avons vérifié que la longueur d'onde de $560\text{ m}\mu$ est satisfaisante : nous avons tracé les spectres d'absorption de la réaction développée sur des quantités de cholestérol correspondant à 2 et 3 g p. 1 000 ; la longueur $560\text{ m}\mu$ est à la fois celle qui correspond à un maximum d'absorption et à la variation d'intensité de coloration la plus forte en fonction de la concentration ; elle est donc particulièrement favorable

La stabilité de la coloration est très bonne et la densité optique reste constante durant deux à trois heures, à condition de conserver les tubes à l'abri d'une lumière trop vive.

La réaction suit la loi de Beer Lambert jusqu'à une concentration de 5 g % de cholestérol cependant au delà de 3 g % il est nécessaire d'utiliser les surcharges optiques dont sont généralement munis les différents photomètres, ceci pour des lectures effectuées en cuves de 1 cm de traversée.

Nous avons toujours obtenu des droites d'étalonnage passant par l'origine des axes en réglant le zéro de l'appareil sur le tube O de la gamme étalon.

Ces droites peuvent se trouver légèrement décalées d'un jour à l'autre, phénomène très fréquent en photométrie ; nous conseillons d'inclure un ou deux témoins à 2 g % dans chaque série de dosages, ce qui permet de tracer la droite d'étalonnage valable au moment des mesures.

La solution colorée étant assez visqueuse du fait de sa teneur en acide sulfurique, il faut remplir la cuve de lecture avec soin en évitant la formation de petites bulles d'air. Cet inconvénient disparaît si les tubes de réaction peuvent être lus directement au photomètre.

B - Résultats - Comparaison à la méthode classique de GRIGAUT

La méthode est fidèle ; répétée dix fois sur un même sérum elle nous a donné les résultats suivants, exprimés en graduations du photomètre :

54,2 - 54,5 - 54,5 - 54,8 - 55 - 55 - 55 - 55,2 - 55,6 - 56

soit un écart maximum entre les résultats d'environ 3 % ce qui montre la grande fidélité de l'extraction du cholestérol et de son évaluation.

Nous avons comparé les résultats obtenus par la méthode que nous proposons et par la méthode classique de GRIGAUT selon les Fiches techniques de Chimie biologique de FLEURY (19).

Le tableau, pages 60, 61 et 62, rassemble ces résultats.

Les différences observées entre les deux méthodes sont assez faibles et peuvent être imputées aux erreurs expérimentales.

Depuis l'époque où nous avons établi ces statistiques nous avons eu l'occasion de refaire de très nombreux dosages comparatifs.

Nous indiquons ci-dessous un ensemble de résultats concernant des essais faits en double, ou même en triple, qui montrent, en même temps que la bonne concordance des deux méthodes, la fidélité de chacune.

<u>Méthode de HARLAY</u>	<u>Méthode à FeCl_3</u>
1,97 - 1,99	2,09 - 2,09 - 2,08
2,32 - 2,40	2,36 - 2,36
2,20 - 2,21	2,10 - 2,10 - 2,14
3,12	3,14 - 3,16
2,38 - 2,41	2,34 - 2,28 - 2,32

Cholestérol en grammes pour 1 000 ml de sérum

	<u>Méthode de GRIGAUT</u>	<u>Méthode personnelle au Cl_3Fe</u>	<u>Différences Cl_3Fe - GRIGAUT</u>
1	2,15	2,03	- 0,12
2	1,32	1,35	+ 0,03
3	2,06	1,95	- 0,11
4	0,99	1,10	+ 0,11
5	2,10	1,96	- 0,14
6	1,94	2,05	+ 0,11
7	2,38	2,20	- 0,18
8	2,04	2,12	+ 0,08
9	1,40	1,34	- 0,06
10	1,87	1,78	- 0,09
11	1,39	1,44	+ 0,05
12	1,55	1,64	+ 0,09
13	1,51	1,50	- 0,01
14	1,31	1,30	- 0,01
15	0,96	1,03	+ 0,07

16	2,24	2,28	- 0,06
17	2,36	2,30	- 0,06
18	2,56	2,42	- 0,14
19	1,65	1,63	- 0,02
20	1,33	1,30	- 0,03
21	1,81	1,75	- 0,06
22	1,27	1,29	+ 0,02
23	1,81	1,85	+ 0,04
24	2,22	2,25	+ 0,03
25	1,84	1,85	+ 0,01
26	1,40	1,35	- 0,05
27	1,66	1,62	- 0,04
28	1,48	1,48	0
29	2,19	2,14	- 0,05
30	1,53	1,54	+ 0,01
31	2,80	2,87	+ 0,07
32	2,51	2,56	+ 0,05
33	1,59	1,54	- 0,05
34	1,72	1,70	- 0,02
35	1,12	1,25	+ 0,13
36	1,63	1,59	- 0,04
37	2,08	1,90	- 0,18
38	2,29	1,74	- 0,55
39	2,34	2,17	- 0,17
40	2,82	2,56	- 0,26
41	2,61	2,30	- 0,31
42	2,07	2,04	- 0,03
43	2,18	2,08	- 0,10
44	2,34	2,50	+ 0,16
45	1,85	1,90	+ 0,05
46	2,13	2,38	+ 0,25
47	2,09	2,14	+ 0,05
48	2,13	2,15	+ 0,02
49	2,52	2,42	- 0,10
50	3,09	2,81	- 0,28
51	2,05	2,16	+ 0,11
52	2,20	2,20	0
53	2,87	2,60	- 0,27
54	2,68	2,46	- 0,22
55	3,43	3,46	+ 0,03
56	2,24	2,08	- 0,16
57	2,68	2,57	- 0,11
58	2,32	2,50	+ 0,18
59	1,86	2,16	+ 0,30
60	2,46	2,48	+ 0,02
61	2,40	2,52	+ 0,12
62	1,29	1,44	+ 0,15
63	2,14	2,26	+ 0,12
64	2,22	2,28	+ 0,06
65	2,73	2,70	- 0,03
66	2,03	2,14	+ 0,11

67	2,04	2,02	- 0,02
68	2,22	2,32	+ 0,10
69	1,90	2,09	+ 0,19
70	1,61	1,76	+ 0,15
71	2,46	2,53	+ 0,07
72	2,86	2,78	- 0,08
73	2,42	2,60	+ 0,18
74	2,24	2,40	+ 0,16
75	2,61	2,83	+ 0,22
76	2,83	2,97	+ 0,14
77	2,40	2,56	+ 0,16
78	1,51	1,60	+ 0,09
79	1,75	1,70	- 0,05
80	2,22	2,25	+ 0,03

C - Etude statistique

La simple comparaison des résultats obtenus dans le dosage du cholestérol par la technique classique de GRIGAUT et par la méthode au chlorure ferrique, que nous proposons, permet déjà d'apprécier la bonne concordance des valeurs trouvées, malgré des écarts qui peuvent atteindre 0,30 g.

Il nous a paru logique de justifier cette impression par une étude statistique, susceptible d'être appliquée chaque fois que l'on est amené à comparer deux méthodes de dosage d'un même corps.

Nous nous sommes référés pour cette étude à plusieurs ouvrages (27) (46) (52) (75) (91) (93).

Le problème est le suivant :

Nous avons une série de couples de résultats de dosages du cholestérol total par la méthode classique de GRIGAUT que nous désignons par X, pour simplifier, et par la méthode au chlorure ferrique, désignée par Y, appliquées chacune en un seul exemplaire sur un même sérum. Les sérums analysés sont tous différents, venant d'individus sains ou malades.

Est-ce que la méthode proposée a une spécificité identique à la méthode de GRIGAUT prise comme référence ? Il serait en effet possible que la réaction au chlorure ferrique soit influencée par la présence d'autres corps, voisins ou non du cholestérol.

D'autre part, est-ce que les deux méthodes donnent des résultats aussi précis ?

Pour répondre à ces questions, il nous faut étudier la corrélation entre les résultats des deux méthodes X et Y.

Il y a corrélation positive entre deux séries de valeurs quand à toute variation d'une valeur d'une série correspond une variation de même sens dans la seconde série. La corrélation s'exprime par un coefficient de corrélation, qui atteint la valeur limite de + 1 pour une corrélation parfaite positive.

Le calcul nécessite l'application de formules classiques de la statistique, rassemblées dans le tableau p. 65

Nous trouvons un coefficient de corrélation $r = + 0,963$, dont les limites calculées avec un coefficient de sécurité de 95 % se situent à 0,942

+ 0,978.

Cette valeur, voisine de + 1, nous montre qu'il existe une forte corrélation entre les résultats obtenus par la méthode de GRIGAUT et par la méthode au chlorure ferrique.

Quand il y a corrélation entre deux grandeurs X et Y, elles sont liées par une équation de la forme $Y = a + b X$.

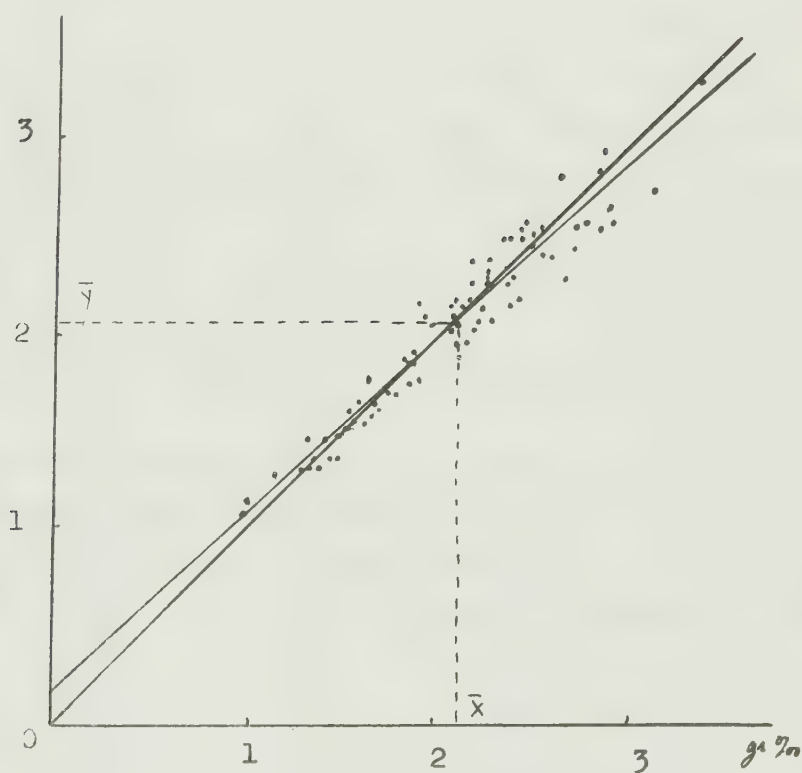
Si X et Y sont des grandeurs soumises à des variations dues au hasard, la droite représentant l'équation $Y = a + b X$ se transforme en une nuée de points, qui constituent un diagramme de dispersion. Le calcul permet de remplacer ce diagramme par une droite dite de régression qui représente au mieux la relation entre X et Y. Si l'on représente les variations de Y en choisissant X comme variable indépendante, c'est-à-dire la variation de Y en fonction de X, on obtient la droite de régression de Y en X ; la variation de X en fonction de Y conduit à une deuxième droite de régression.

CALCUL DU COEFFICIENT DE CORRELATION EXISTANT ENTRE LES RESULTATS
OBTENUS PAR LA METHODE DE GRIGAUT ET PAR LA METHODE A Fe Cl₃.

Nombre de couples de résultats	N = 80	
Somme des valeurs :	S X = 165,00	S Y = 164,86
Moyenne :	$\bar{X} = \frac{165}{80} = 2,0625$	$\bar{Y} = \frac{164,86}{80} = 2,06075$
Somme des carrés :	SX ² = 360,6096	S Y ² = 358,6360
Somme des carrés des écarts :	S _x ² = 360,6096 - $\frac{(165)^2}{80}$	S _y ² = 358,6360 - $\frac{(164,86)^2}{80}$
S _n ² = S (A - $\bar{A}$) ²		
= SA ² - $\frac{(SA)^2}{N}$	= 20,2971	= 18,9008
Variance = $\frac{S_n^2}{N} = \sigma^2$	$\sigma_x^2 = 20,2971 \frac{20,2971}{80}$	$\sigma_y^2 = \frac{18,9008}{80}$
	= 0,2 533	= 0,2362
Ecart type = déviation		
Standard = σ	$\sigma_x = 0,503$	$\sigma_y = 0,486$
Somme des produits croisés	SXY = 358,8558	
Covariance = p = $\frac{S_{xy}}{N} = \frac{1}{N}$	$\left[SXY - \frac{(SX)(SY)}{N} \right]$ $= \frac{1}{80} \left[358,8558 - \frac{(165)(164,86)}{80} \right] = 0,2354$	
Coefficient de régression :	$h_{y/x} = \frac{P}{\sigma_x^2} = 0,929$	
Coefficient de régression :	$h_{x/y} = \frac{P}{\sigma_y^2} = 0,996$	
Coefficient de corrélation :	$r = \frac{P}{\sigma_x \sigma_y} = + 0,963$	

DIAGRAMME DE DISPERSION DES RESULTATS

Méthode au Cl_3Fe
gr %



méthode de Grigaut

La figure (p.66) représente le diagramme de dispersion des résultats avec les droites de régression de Y en X (droite A) et de X en Y (droite B) ; Ces deux droites sont très voisines de la bissectrice de l'angle des axes des x et des y qui représente une corrélation parfaite entre les deux méthodes de dosage d'un même corps.

Il serait possible que les deux séries de résultats soient en corrélation, sans pour cela qu'elles correspondent au même produit dosé ; il est donc nécessaire de vérifier que les deux méthodes sont équivalentes. Le fait que nous avons trouvé une bonne corrélation positive nous autorise à appliquer la méthode des couples.

En effet, nous avons une série de couples de résultats, caractérisés par une différence positive ou négative entre les résultats en prenant la méthode X comme référence. Si les deux méthodes étaient équivalentes, les différences devraient être toutes nulles. En fait on observe des différences et il faut savoir si elles sont imputables au hasard c'est-à-dire à des causes non contrôlables, impossibles à éliminer, en l'occurrence des erreurs expérimentales, ou au contraire si ces différences doivent être imputées systématiquement à une méthode de dosage.

La méthode des couples consiste à rechercher si la moyenne des différences observées est significativement différente de zéro. Cette étude s'effectue par le test du t de STUDENT appliqué à l'écart type de la moyenne $\bar{d}$ des différences, selon les formules :

$$\sigma_{\bar{d}} = \sqrt{\frac{Sd^2 - N\bar{d}^2}{N(N-1)}} \quad t = \frac{\bar{d}}{\sigma_{\bar{d}}}$$

En se reportant à une table du t on conclue si la différence observée est significative ou non pour le coefficient de sécurité que l'on s'est fixé.

Les calculs sont rassemblés dans le tableau p.

Le t calculé est de 0,112.

Dans la table du t, pour un coefficient de sécurité de 95 % et $80 - 1 = 79$ degrés de liberté, nous trouvons $t = 1,99$, valeur supérieure au t calculé : donc les différences observées entre les résultats des deux méthodes ne sont pas significatives et peuvent être imputées au seul fait du hasard

CALCUL DE LA MOYENNE DES DIFFERENCES OBSERVEES
ENTRE LES METHODES DE GRIGAUT ET AU CHLORURE FERRIQUE

Sérum n°	Cholestérol en g p. 1 000		Différence		d^2
	Grigaut	Cl_3Fe	$d = Y - X$		
	X	Y	négative	positive	
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
1	2,15	2,03	0,12		0,0144
2	1,32	1,35		0,03	0,0009
3	2,06	1,95	0,11		0,0121
4	0,99	1,10		0,11	0,0121
5	2,10	1,96	0,14		0,0196
6	1,94	2,05		0,11	0,0121
7	2,38	2,20	0,18		0,0324
8	2,04	2,12		0,08	0,0064
9	1,40	1,34	0,06		0,0036
10	1,87	1,78	0,09		0,0081
11	1,39	1,44		0,05	0,0025
12	1,55	1,64		0,09	0,0081
13	1,51	1,50	0,01		0,0001
14	1,31	1,30	0,01		0,0001
15	0,96	1,03		0,07	0,0049
16	2,34	2,28	0,06		0,0036
17	2,36	2,30	0,06		0,0036
18	2,56	2,42	0,14		0,0196
19	1,65	1,63	0,02		0,0004
20	1,33	1,30	0,03		0,0009
21	1,81	1,75	0,06		0,0036
22	1,27	1,29		0,02	0,0004
23	1,81	1,85		0,04	0,0016
24	2,22	2,25		0,03	0,0009
25	1,84	1,85		0,01	0,0001
26	1,40	1,35	0,05		0,0025
27	1,66	1,62	0,04		0,0016
28	1,48	1,48			0,0000
29	2,19	2,14	0,05		0,0025
30	1,53	1,54		0,01	0,0001
31	2,80	2,87		0,07	0,0049
32	2,51	2,56		0,05	0,0025
33	1,59	1,54	0,05		0,0025
34	1,72	1,70	0,02		0,0004
35	1,12	1,25		0,13	0,0169
36	1,63	1,59	0,04		0,0016
37	2,08	1,90	0,18		0,0324
38	2,24	1,74	0,55		0,3025
39	2,34	2,17	0,17		0,0289
40	2,82	2,56	0,26		0,0676

(Suite)

41	2,61	2,30	0,31		0,0961
42	2,07	2,04	0,03		0,0009
43	2,18	2,08	0,10		0,0100
44	2,34	2,50		0,16	0,0256
45	1,85	1,90		0,05	0,0025
46	2,13	2,38		0,25	0,0625
47	2,09	2,14		0,05	0,0025
48	2,13	2,15		0,02	0,0004
49	2,52	2,42	0,10		0,0100
50	3,09	2,81	0,38		0,0784
51	2,05	2,16		0,11	0,0121
52	2,20	2,20			0,0000
53	2,87	2,60	0,27		0,0729
54	2,68	2,46	0,22		0,0484
55	3,43	3,46		0,03	0,0009
56	2,24	2,08	0,16		0,0256
57	2,68	2,57	0,11		0,0121
58	3,32	2,50		0,18	0,0324
59	1,86	2,16		0,30	0,0900
60	2,46	2,48		0,02	0,0004
61	2,40	2,52		0,12	0,0144
62	1,29	1,44		0,15	0,0225
63	2,14	2,26		0,12	0,0144
64	2,22	2,28		0,06	0,0036
65	2,73	2,70	0,03		0,0009
66	2,03	2,14		0,11	0,0121
67	2,04	2,02	0,02		0,0004
68	2,22	2,32		0,10	0,0100
69	1,90	2,09		0,19	0,0361
70	1,61	1,76		0,15	0,0225
71	2,46	2,53		0,07	0,0049
72	2,86	2,78	0,08		0,0064
73	2,42	2,60		0,18	0,0324
74	2,24	2,40		0,16	0,0256
75	2,61	2,83		0,22	0,0484
76	2,83	2,97		0,14	0,0196
77	7,40	2,56		0,16	0,0256
78	1,51	1,60		0,09	0,0081
79	1,75	1,70	0,05		0,0025
80	2,22	2,25		0,03	0,0009

et nous dirons que nous avons au moins 95 chances sur 100 pour que les méthodes soient équivalentes.

Nous pouvons également calculer la déviation standard de la différence observée entre les résultats. Ce calcul est effectué sur la valeur absolue de d , que nous représentons par Δ .

Nous avons :

$$S \Delta = 4,26 + 4,12 = 8,38$$

$$\bar{\Delta} = \frac{8,38}{80} = 0,10475$$

$$S \Delta^2 = 1,5340$$

$$\sigma^2 \Delta = \frac{1}{80} \left[1,5340 - \frac{(8,38)^2}{80} \right] = 0,0082$$

$$\sigma \Delta = \sqrt{0,0082} = 0,090$$

$$\text{d'où } \Delta = \bar{\Delta} \pm 2 \sigma \Delta = 0,104 \pm 0,18$$

ce qui nous indique que nous avons 95 % de chances que la différence entre les deux méthodes soit comprise entre 0 et 0,28.

$$\text{La déviation standard de } \bar{\Delta} = \frac{\sigma \Delta}{\sqrt{N}} = \frac{0,090}{\sqrt{80}} = 0,01 = \sigma \bar{\Delta}$$

La différence moyenne sera donc :

$$\bar{\Delta} \pm 2 \sigma \bar{\Delta} = 0,104 \pm 0,02$$

Pour un sérum normal d'une concentration moyenne de 2 g p. 1 000 en cholestérol, nous aurons donc une différence moyenne de 0,10 g p. 1 000 entre les deux méthodes de dosage, ou $\frac{0,10}{2,00} = 5 \%$

De cette étude nous pouvons conclure :

Il y a au moins 95 chances sur 100 pour que les deux méthodes de dosage du cholestérol total du sérum soient équivalentes ; la différence moyenne entre les résultats est de l'ordre de 5 % ; elle est imputable aux inévitables erreurs expérimentales. Nous nous trouvons donc dans des limites de précision satisfaisantes pour des dosages de pratique courante en clinique médicale.

La méthode proposée permet donc une estimation valable du cholestérol sérique total ; les manipulations moins longues et la stabilité de la réaction colorée lui confèrent des avantages certains sur la technique de GRIGAUT, avantages d'autant plus appréciables que le nombre de dosages à effectuer simultanément est plus élevé.

D - Application dans la séparation du cholestérol et de ses esters.

Devant les résultats satisfaisants obtenus dans le dosage du cholestérol total, notre but a été d'appliquer la réaction au chlorure ferrique au dosage du cholestérol estérifié.

Nous avons séparé le cholestérol libre de ses esters d'une part au moyen de digitonoside, d'autre part à l'aide de l'alumine.

1) Essai d'application de la réaction au chlorure ferrique après utilisation du digitonoside.

La technique de précipitation directe du cholestérol libre dans le sérum mise au point par TORRES nous a paru intéressante. Nous nous sommes donc adressés d'abord à cette méthode, en substituant seulement dans le dosage final le réactif au chlorure ferrique au réactif au chlorure de cobalt utilisé par l'auteur (82) (83).

Au sérum (0,1 ml) dilué par de l'acide acétique puis de l'eau on ajoute une solution de digitonoside dans l'alcool absolu. Dans les concentrations respectives obtenues en acide acétique (20 %) et en alcool (67 %), la précipitation du complexe, déclanchée par une forte agitation, est complète en 30 minutes.

Une remarque s'impose quant à l'ordre d'introduction des réactifs. Si on suit celui indiqué par l'auteur : sérum, acide acétique, eau distillée et solution de digitonoside, il se produit immédiatement une précipitation de protéines. TORRES insiste pourtant sur le fait que, dans ces conditions, " la précipitation du cholestérol libre est complète en une demi-heure, sans précipiter les protéines ".

Nous avons alors changé l'ordre des réactifs, c'est-à-dire, sérum-eau-acide acétique- solution de digitonoside. Dans ces conditions, les protéines ne précipitaient pas.

La première centrifugation n'a jamais donné un liquide surnageant limpide. Nous pensions que le temps nécessaire à la formation du complexe était peut-être insuffisant (30 minutes).

En effet, dans d'autres techniques de précipitation du digitonoside sur des quantités de cholestérol similaires, le temps de contact jugé nécessaire est très variable : nul (BROWN et coll.), 10 minutes (COURCHAIN-LEFFLER), 10 à 15 minutes (CRAWFORD), 30 minutes (TORRES), 1 heure (SEARCY-COSTELLO), 4 heures à une nuit (ROSENTHAL-JUD).

Nous avons donc prolongé le contact qui a respectivement duré 4 heures et une nuit. La centrifugation n'a pas donné de liquide plus clair qu'après 30 minutes.

Nous avons essayé de réaliser une précipitation des esters par le digitonoside en solution acétique. In dépendamment de l'efficacité du réactif, nous avons constaté que la présence de digitonoside faussait la réaction au perchlorure de fer, donnant une teinte plus ou moins jaunâtre.

2) Application de la réaction au chlorure ferrique après absorption sur alumine.

Pour nous trouver dans les mêmes conditions que celles que nous avons proposées dans notre méthode (à savoir solution acétique de déprotéinisation) nous avons tenté de reprendre le résidu d'évaporation du solvant d'absorption par de l'acide acétique. Mais comme nous l'avons signalé (p. 52) la redissolution du cholestérol dans ce solvant est difficile. Malgré nos efforts nous n'avons pu obtenir des résultats d'une fidélité certaine.

Au moment où nous faisons ces essais, AGNERAY et coll. (1) (2) publiaient leur méthode et se heurtant aux mêmes difficultés de reprise par l'acide acétique proposaient comme solvant chloroforme-acétate d'éthyle.

Nous avons essayé personnellement d'améliorer la reprise du cholestérol en utilisant un mélange acide acétique - acétate d'éthyle. Voici quelques résultats comparatifs obtenus dans ces conditions par la méthode de HARLAY avec séparation au digitonoside, et notre méthode de séparation sur alumine (et calcul) avec reprise par 1 ml d'acétate d'éthyle + 2 ml acide acétique (tous les essais ont été faits en double)

Méthodes	HARLAY	personnelle
Cholestérol estérifié	1,51 - 1,58	1,37 - 1,53
	1,58 - 1,62	1,56 - 1,56
	1,46 - 1,50	1,46 - 1,51
	1,32 - 1,40	1,34 - 1,15

La réaction au chlorure ferrique peut donc être utilisée après séparation des esters sur alumine. L'usage d'un solvant du cholestérol convenant à ce dosage est la seule difficulté.

CONCLUSIONS

Cherchant à obtenir une méthode rapide de séparation du cholestérol de ses esters au moyen de l'alumine, nous nous sommes inspirés des différentes techniques de chromatographie pour établir une séparation par simple adsorption sur alumine, sans élution.

Nous avons montré qu'en présence de quantités données d'adsorbant et de solvant un pourcentage pratiquement constant de cholestérol estérifié soumis à l'adsorption reste en solution tandis que la totalité du cholestérol libre est fixée.

Nous indiquons les conditions précises telles que la quantité de cholestérol estérifié échappant à la fixation est égale aux $2/3$ de la totalité du cholestérol estérifié. L'application de cette technique à des sérums sanguins indique que la méthode proposée est valable.

Dans la seconde partie de notre travail, nous avons étudié la méthode de dosage du cholestérol au chlorure ferrique.

Nous avons examiné les techniques existantes dans tous leurs détails puis nous avons établi une technique personnelle.

La méthode que nous proposons est fidèle et donne des résultats identiques à ceux obtenus par la méthode de GRIGAUT comme le prouve l'étude statistique que nous avons faite.

Cette méthode est applicable au dosage du cholestérol total aussi bien qu'à celui du cholestérol estérifié.

BIBLIOGRAPHIE

=====

- (1) AGNERAY (J.), PUISIEUX (F.), DOURIS (R. E.) - Séparation du cholestérol libre et du cholestérol estérifié par chromatographie sur alumine.
Ann. Biol. Clin. 1958, 16, 563.
- (2) AGNERAY (J.), PUISIEUX (F.), WEPIERRE (J.) - Microdosage du cholestérol libre et du cholestérol estérifié.
Ann. Biol. Clin. 1959, 17, 178.
- (3) AGNERAY (J.), PUISIEUX (F.) - Dosage du cholestérol libre et du cholestérol estérifié après séparation par chromatographie sur alumine. Sur 1 ml - Microdosage du cholestérol libre et du cholestérol estérifié après séparation par chromatographie sur alumine. Sur 0,1 ml de sérum.
Fiches Techniques APDILA, Supplément au "Pharmacien biologiste" n° 13, 1959.
- (4) AZERAD (F.), LEWIN (J.), GHATA (J.) - Etude de la répartition du cholestérol dans les deux fractions alpha et bêta lipoprotéines du sérum chez l'homme normal et chez 24 sujets atteints d'infarctus du myocarde.
Bull. Mém. Soc. med. Hôp. Paris. 1958, 74, 703.
- (5) BAERTS (A. M.), CLAES (J. H.), JOOSSENS (J. V.) - Les protides des liquides biologiques. "Etude comparative de quelques méthodes de dosage du cholestérol stérique".
4ème colloque St-Jean Hospital, Brugge, 1956.
- (6) BISCHOFF (F.), TURNER (G.) - Spectroscopic Dater for Steroids subjected to Zak color réaction.
Clin. Chem. 1958, 4, 300.
- (7) BROCKMAN (N. H.), SCHODDER (H.) - Aluminium Oxyd mit abgestuftem Adsorptionsvermögen zur chromatographischen Adsorption.
Ber. deut. Chem. Gesell. 1941, 74, 73.
- (8) BROWN (H. H.), ZLATKIS (A.), ZAK (B.), BOYLE (A. J.) - Rapid procedure for determination of free serum cholesterol.
Analyst. Chem. 1954, 26, 297-99.
- (9) BURSTEIN (M.), PRAWERMAN (A.) - Précipitation des bêta lipoprotéines et des chylomicrons par le polyvinyl-pyrrolidone.
Path. Biol. 1959, 7, 1 035.
- (10) BURSTEIN (M.), SAMAILLE (J.) - Dosage des bêta lipoprotéines sériques après précipitation sélective par l'héparine.
Presse méd. 1958, 66, 974.

- (11) BURSTEIN (M.), SAMAILLE (J.) - Sur une nouvelle méthode de dosage du cholestérol lié aux alpha et aux bêta lipoprotéines du sérum.
Clinica Chimica Acta. 1958, 3, 320-327.
- (12) CARR (J. J.), DREKTER (I. J.) - Simplified rapid technic for the extraction and determination of serum cholesterol without saponification.
Clin. Chem. 1956, 2, 353-69.
- (13) CASTAIGNE (A.), AMSELEM (A.) - Etude de la répartition des deux fractions libres et estérifiées du cholestérol entre les alpha et les bêta lipoprotéines.
Ann. Biol. Clin. 1959, 17, 336.
- (14) CHIAMORI (N.), HENRY (R. J.) - Study of the ferric chloride method for determination of total cholesterol and cholesterol ester.
Am. J. Clin. Pathol. 1959, 31, n°4, 305-9.
- (15) CLEMENT (G.), CLEMENT (J.), LOUEDEC (A.) - Sur la séparation des esters de cholestérol à partir d'extraits lipidiques de tissus animaux.
Arch. Sc. physiol. 1954, 8, 233.
- (16) COOK (R. P.) - Cholesterol - Chemistry, Biochemistry and Pathology.
Ac. Press. Inc. Pathol. N. Y. 1958.
- (17) CORMIER (M.), BOULVARD (Ch.), JOUAN (P.) - A propos de la précipitation du cholestérol non estérifié par la digitonine.
Bull. Soc. Pharm. Ouest. 1960, 2, 23-26.
- (18) CORMIER (M.), JOUAN (P.) - Séparation des lipides totaux du sérum sanguin par chromatographie sur papier.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1958, 40 171.
- (19) COSTELLO (R. L.), GURRAM (M. D.) - Modified turbidimetric procedure for the determination of cholesterol.
Am. J. Clin. Pathol. 1957, 27, 108-16.
- (20) COURCHAINE (A. J.), MILLER (W. H.), STEIN (D. B.) - Rapid semi-microprocedure for estimating free and total cholesterol.
Clin. Chem. 1959, 5, 609-14.
- (21) CRAWFORD (N.) - An improved method for the determination of free and total cholesterol using the ferric chloride reaction.
Clin. Chim. Acta. 1958, 3, 357-67.
- (22) DEVIS (R.) - Les liaisons entre stéroïdes et protéines dans l'organisme animal.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1955, 37, 562.
- (23) EDER (H. A.) - The lipoproteins of human serum.
Am. J. Med. 1957, 3, 269.

- (24) FERRAND (P.), RIEFFEL (C.) - Etude de la méthode de ZAK pour le dosage du cholestérol sérique par la réaction de ZLATKIS et ZAK.
Ann. Biol. Clin. 1958, 16, 299-307.
- (25) FILLERUP (D. L.), HEAD (J. F.) - Chromatographic separation of the plasma lipids.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1953, 83, 574-577.
- (26) FLEURY (P.) - Fiches techniques de Chimie biologique : Edition Vega - Paris.
- (27) FISHER (R. A.) - Les méthodes statistiques adaptées à la recherche scientifique. Trad. de l'anglais par BERTRAND I. Presses Universitaires de France, Paris, 1947.
- (28) FRECHIN - Sur la cholestérine.
Thèse Pharm. Nancy. 1927.
- (29) GARDNER (J. A.), GAINSBOROUGH (H.) - Studies on the cholesterol content of normal human plasma. Part. II . The attraction of the proteins of plasma for sterols.
Bioch. J. 1927, 21, 141.
- (30) GILLIES (G. A.), LINDGREN (F. T.), CASON (J.) - Composition of fatty acids from certain fractions of blood lipoproteins.
J. Am. Chem. Soc. 1956, 78, 4 103.
- (31) HANDEL (E. Van) - Separation and chemical assay of lipide Classes.
J. Am. Oil' Chem. Soc. 1959, 36, 293.
- (32) HANSEN (P. W.), DAM (H.) - Paper chromatography and colorimetric determination of free and esterified cholesterol in very small amounts of blood.
Acta chem. Scand. 1957, 11, 1658.
- (33) HENLY (A. A.) - The determination of serum cholesterol.
Analyst. 1957, 82, 286.
- (34) HERRMANN (R. G.) - Determination of serum and tissue cholesterol.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1957 94, 503.
- (35) HESS (W. C.) - Chromatographic separation of cholesterol and cholesterol esters in blood.
J. Lab. Clin. Med. 1947, 32, 1163.
- (36) HESSE (G.), DANIEL (I.), WOHLLEBEN (G.) - Aluminiumoxyde für die chromatographische Analyse und Versuche zu ihrer standardisierung.
Angew. Chem. 1952, 64, 103.
- (37) HOUGET (J.), BOUTOU (G.) - Séparation et dosage des divers constituants lipidiques dans 1 cm³ de plasma.
Bull. Soc. Chimie. Biol. 1958, 40, 1663.

- (38) KANNER - Dosage direct de la cholestérine libre dans le sang par une méthode sans précipitation.
C. R. Soc. Biol. 1931, 108, 383.
- (39) KEEGAN (P.), GORDON GOULD (R.) - Isolation of a crystalline cholesteryl ester from normal plasma.
Fed. Proc. 1953, 12, 228.
- (40) KEER (L. M. H.), BAULD (W. E.) - The chromatographic separation of free and combined plasma cholesterol.
Biochem. J. 1953, 55, 872.
- (41) KEUNING (K. J.), VAN DIJK (G. J.), WIGGERS DE VRIESS (M. J.) - Determination and ajustement of the activity of adsorbents for chromatography and of the eluting power of elution solvents by means of the "shake test".
Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 1957, 76, 747.
- (42) KHALYL (N. A.) - Le cholestérol du sang.
An. Fac. Med. et Pharm. Beyrouth. 1932, 1, 365.
- (43) KINLEY (L. J.), KRAUSE (R. F.) - Serum cholesterol determination as affected by vitamine A.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. USA, 1958, 99, n° 1, 244-5.
- (44) KINSELL (L. W.), MICHAELS (G. D.), FUKAYAMA (G.) - Plasma cholesterol ester fatty acid composition in relation to diet.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1958, 98, 829.
- (45) KLUNGSOYR (L.), HAUKENES (E.), GLOSS (K.) - A method for the determination of cholesterol in blood serum.
Clin. Chim. Acta. 1958, 3, 514-18.
- (46) LAMOTTE (M.) - Introduction à la biologie.
Masson, Paris, 1948.
- (47) LEFFLER (H. H.) - Estimation of cholesterol in serum.
Am. J. Clin. Path. 1959, 31, 310-13.
- (48) LEMAIRE (A.), COTTET (J.), LOEPER (J.), LEDERMANN (S.) - Stabilité du cholestérol sérique et athérosclérose.
Presse méd. 1958, 66, 1431.
- (49) LEVY (M.), MARCUS (A.) - Etude comparée du cholestérol et des lipoprotéines de faibles densités.
Journal d'Urologie. 1958, 64, 172.
- (50) LEWIN (J.), GHATA (J.), AZERAD (E.) - Les lipoprotéines plasmatiques humaines.
Pathol. et Biol. 1958, 6, 1567.
- (51) LIEBESCHUTZ (R.) - Colesterol sanguineo - Tecnica para el fraccionamiento sin digitonine.
Rev. Asoc. Bioq. Argent. 1956, 21, 203.

- (52) LISON (L.) - Statistique appliquée à la Biologie expérimentale.
L. Gauthier-Villars. Paris 1958.
- (53) Mac INTYRE (I), RALSTON (M.) - Direct determination of serum cholesterol.
Biochem. J. 1954, 56, Xliii.
- (54) MACHEBOEUF (M.) - Recherche sur les lipides, les stérols et les protéides du sérum et du plasma sanguin.
Thèse Sc. Paris. 1928.
- (55) MARINETTI (G. V.), STATZ (E.) - Direct chromatography of serum lipids without solvent extraction.
Biochem. Biophys. Acta. 1960, 37, 571-3.
- (56) MICHALEC (C.) - The nature of cholesterol esters in human blood serum.
Biochem. Biophys. Acta. 1956, 19, 187.
- (57) MICHAELS (G.D.), FUKAYAMA (L.), CHIN (H. P.), WHEELER (P.) -
Technics for separation of plasma cholesterol esters for determination of iodine value and of cholesterol.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1958, 98, 826-9.
- (58) MIKOL (Cl.) - Chromatographie su cholestérol sur papier paraffiné.
Sem. Hôpit. 1959, 7, 2091 (Path. Biol.).
- (59) MIKOL (Cl.) - Chromatographie sur papier et stabilité des liaisons protido-cholestérolées au cours de l'athérosclérose.
Presse méd. 1959, 67, 1144.
- (60) PAGET (M.) - Quelques aspects de la Biochimie du cholestérol.
Ann. Biol. Clin. 1957, 15, 127.
- (61) PEARSON (S.), STERN (S.), Mac GAVACK (T. H.) - A rapid accurate method for the determination of total cholesterol in serum.
Anal. Chem. 1953, 25, 813.
- (62) PICCHIO (E.), ROTTINI (E.), FIORENTINI (M.) - La colesterolemia :
metodi di dosaggio. Considerazione tecniche e cliniche.
Minerva Medica. 1957, 48, 3327-31.
- (63) PIERFITTE (M.), BARRIER (J.) - Microdosage du cholestérol sérique
par une réaction au chlorure ferrique.
Bull. Soc. Pharm. Nancy, 1959, n° 40, 31.
- (64) PIERFITTE (M.), BARRIER (J.) - Etude statistique de deux méthodes
de dosage du cholestérol sérique : méthode de GRIGAUT et méthode au
chlorure ferrique.
Bull. Soc. Pharm. Nancy, 1959, n° 40, 41.
- (65) PIERRART (G.) - Recherche sur le dosage du cholestérol et de ses
esters dans le sérum.
Thèse Pharm. Lille, 1939.

- (66) QUAIFE (M. L.), GEYER (R. P.) - Rapid paper chromatographic micro-assay of free and ester cholesterol of blood.
Anal. Chem. 1959, 31.
- (67) RHODES (D. H.) - Interference by polyunsaturated fatty acids in the determination of cholesterol.
Biochem. J. 1959, 71, 26 P
- (68) RILEY (C.), NUNN (R. F.) - The cholesterol esters circulating in human blood in health.
Biochem. J. 1960, 74, 56-61.
- (69) ROSENTHAL (L. M.), JUD (L.) - Microestimation of serum cholesterol and esters in finger tip blood.
J. Lab. Clin. Med. 1958, 51, 143.
- (70) ROSENTHAL (L. M.), PFLUKE (M. L.), BUSCAGLIA (S.) - A stable ion reagent for the determination of cholesterol.
J. Lab. Clin. Med. USA, 1957, 50, 318-22.
- (71) SCANU (A.), PAGE (I. H.) - Separation and characterization of human serum chylomicrons.
J. Exp. Med. 1959, 109, 239.
- (72) SCHIFF (H.) - Zur Nachweisung des Cholesterins.
Ann. Chem. Pharm. 1860, 115, 313.
- (73) SCHON (H.), GEY (F.) - Zur elutionschromatographischen Trennung des freien und veresterten Cholesterins in organ und Serumfetten und direkten Kolorimetrischen Bestimmung.
Ztsch. Physiol. Chem. 1956, 303, 81.
- (74) SEARCY (R.) - A new color reaction for the quantitation of serum cholesterol.
Clin. Chem. Acta. 1960, 5, 192.
- (75) SNEDECOR (E. W.) - Statistical methods applied to experiments in agriculture and Biologie.
Collegiate Press. Inc. Ames Iowa. 1946.
- (76) SOBEL (A. E.), DREKTER (I. J.), NATELSON (S.) - Estimation of small amounts of cholesterol as the pyridine cholesteryl sulfate.
J. Biol. Chem. 1936, 115, 381.
- (77) SOBEL (A. E.), GOODMAN(J.), BLAU (M.) - Cholesterol in blood serum. Studies of microestimation as the pyridinium cholesteryl sulfate.
An. Chem. 1951, 23, 516.
- (78) TALIBERTI (J. C.) - Nuevo metodo para la determinacion do colesterol libre usando sulfato de oxiquinolina.
Rev. Fac. Ci. quim. Argent. 1957, 30, 109.

- (79) TAYEAU (F.) - Recherches sur la nature, la stabilité et le rôle biologique des liaisons unissant les lipides aux protéides dans le sérum sanguin.
Thèse Sc. Bordeaux. 1939.
- (80) TAYEAU (F.) - A propos de l'estérification du cholestérol sérique.
Arch. mal. App. Dig. 1955, 44, 740.
- (81) TAYEAU (F.) - Etat et rôle du cholestérol circulant.
Ann. Biol. Clin. 1957, 15, 177-194.
- (82) TORRES (J. F.) Metodo directo para dosaje de colestero total en suero
Rev. Assoc. Bioquim. Argent. 1957, 22, 28-33.
- (83) TORRES (J. F.) Determinacion de colestero libre in suero sin extraccion.
Rev. Assoc. Bioquim. Argent. 1957, 22, 336-41.
- (84) TRAPPE (W.) - Die Trennung von biologischen Fettstoffen aus ihren natürlichen Gemischen durch Anwendung von Adsorptionssäulen. I. Mitteilung. Die elutrope Reihe der Lösungsmittel.
Bioch. Ztschr. 1940. 305, 150.
- (85) TRAPPE (W.) - Id. - II Mitteilung. Abtrennung der phosphor und stickstofffreien Lipoidfraktionen.
Bioch. Ztschr. 1940 306, 316.
- (86) TRAPPE (W.). Id. IV Mitteilung - id. -
Bioch. Ztschr. 1940, 307, 97.
- (87) TRAPPE (W.) - Eine einfache Methode zur getrennten quantitativen Bestimmung von freiem und verestertem cholesterin mit 0,1 cm Blut aus der Fingerbeere.
Klin. Wschr. 1942, 21, 651.
- (88) TRAPPE (W.) - Eine einfache Methode zur getrennten quantitativen Bestimmung von freiem und verestertem Cholesterin im Blutserum ohne Digitonin-fällung und Verseifung.
Ztschr. Physiol. Chem. 1942, 273, 177.
- (89) VANNINI (P.). DEL VECCHIO (A.) - Valutazione di un novo metodo rapido di dosaggio del colestero nel siero per colorimetria diretta.
Arch. E. Maragliano Pat. e Clin. 1956, 12, 793-801.
- (90) VELLUZ (L.) - Substances naturelles de synthèse.
Volume IV. Masson Paris. 1952.
- (91) VESSEREAU (A.) - Methodes statistiques en Biologie et en Agronomie
J. B. Baillères et Fils. Paris. 1948.

- (92) WYCOFF (H. D.), PARSONS (J.) - Chromatographie microassay for cholesterol and cholesterol esters.
Science, 1957, 125, 347.
- (93) YODEN (W. J.) - Statistical Methods for Chemist. John Wiley and Sons. New York, 1951.
- (94) ZAK (B.) - Simple rapid microtechnic for serum total cholesterol.
Am. J. Clin. Path. 1957, 27, 583-88.
- (95) ZLATKIS (A.), ZAK (B.), BOYLE (A. J.) - A new method for the direct determination of serum cholesterol.
J. Lab. Clin. Med. 1953, 41, 486-92.
- (96) ZWIKKER (J.J.L.) - De afzondering der sterinen vit vetten.
Pharm. Weekblad. 1917, 101.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
Etat du cholestérol dans le sérum sanguin	1
Liaison du cholestérol aux protéines	2
Lipoprotéines alpha et lipoprotéines bêta	3
Extractibilité du cholestérol	4
Intérêt actuel du dosage du cholestérol et des ses esters ..	6
1ère PARTIE : Séparation des stérides à l'aide de l'alumine .	8
I - Aperçu sur les différentes méthodes de séparation..	9
A - Combinaison du cholestérol libre.....	9
a) au digitonoside	9
b) à d'autres substances	10
B - Séparation par solvants.....	10
C - Séparation par chromatographie	10
II - Etude particulière de la chromatographie sur colonne	12
A - Etudes préliminaires de TRAPPE	12
a) Adsorption des lipides en solution organique	
mise au contact d'absorbants	12
b) Adsorption des lipides sur colonne adsor	
bante traversée par des solvants.....	14
B - Analyse des méthodes utilisant l'acide silicique	
et l'alumine	15
a) Méthodes utilisant l'acide silicique	15
b) Méthodes utilisant l'alumine	19
1°) Prise d'essai	19
2°) Mode d'extraction	19
3°) Caractéristiques de l'alumine utilisée	21
4°) Quantité d'alumine	21
5°) Elution du cholestérol	22
6°) Dosage colorimétrique	22
III - Technique personnelle d'adsorption sur alumine ..	23
A - Conditions et matériel d'expérimentation	23
1°) Nature des esters servant d'étalon....	23
2°) Quantités de cholestérol mises en	
oeuvre.....	23
3°) Nature de l'alumine	23
4°) Solvants	24
5°) Dosage colorimétrique	24
6°) Méthode de référence pour le dosage	
des esters de cholestéryle	24

<u>B - Essais de récupération totale des esters de cholestéryle</u>	25
1° - Choix de la quantité d'alumine à utiliser.....	26
2° - Adsorption du cholestérol estérifié en solution dans l'éther de pétrole additionné de chloroforme	28
3° - Comportement du cholestérol libre en utilisant les solvants d'AGNERAY	30
4° - Analyse de la solution de cholestérol libre et esté- rifié après adsorption sur alumine et analyse des sol- vants au lavage de l'alumine	32
<u>C - Cholestérol estérifié échappant à l'adsorption sur alumine</u>	33
1° - Influence de la quantité d'alumine	34
2° - Influence du volume de solution soumis à l'adsorption	35
3° - Influence de la nature du solvant	36
<u>D) Emploi de diverses alumines et d'autres adsorbants</u>	38
1°) Alumines	38
a) Caractéristiques des alumines essayées	38
b) Adsorption comparée du cholestérol estérifié (stéarate) sur l'alumine Prolabo 20 995 (n° 2) et l'alumine Merck	39
2°) Autres adsorbants	
a) Comparaison de la magnésie, du carbonate de cal- cium, du lactose	41
b) Adsorption du cholestérol estérifié (stéarate) sur carbonate de calcium dans différentes conditions..	42
<u>E - Méthode proposée pour le dosage du cholestérol estérifié dans le sérum sanguin</u>	43
<u>2ème PARTIE : Dosage du cholestérol par la méthode du chlorure ferrique</u>	45
I - Origine de la réaction	46
II - Utilisation quantitative	47
a) Méthode de ZLATKIS, ZAK, BOYLE.....	47
a) Critiques.....	48
b) perfectionnements de la méthode	48
b) Etude générale des différentes techniques	49
1) Quantité de sérum mise en oeuvre	49
2) Modes d'élimination des protéines	49
3) Solvants de reprise des lipides	49
4) Composition du réactif au chlorure ferrique...	52
5) Exécution de la réaction	52

<u>III - Méthode personnelle</u>	53
A - Description de la technique proposée	54
1 - Principe	54
2 - Réactifs	54
3 - Mode opératoire	55
a) Déprotéinisation.....	55
b) Réaction	56
c) Lecture	56
B - Résultats - Comparaison à la méthode classique de GRIGAUT	59
C - Etude statistique	63
D - Application dans la séparation du cholestérol et de ses esters	71
1 - Essai d'application de la réaction au chlorure ferrique après utilisation du gigitonoside	71
2 - Application de la réaction au chlorure ferrique après adsorption sur alumine	72
CONCLUSIONS	73
BIBLIOGRAPHIE	74

Vu

NANCY, le 12 Décembre 1960

Président de Thèse

Professeur : F. KAYSER

Vu et approuvé

NANCY, le 12 Décembre 1960

Le Doyen de la Faculté

F. KAYSER

Vu et permis d'imprimer

NANCY, le 12 Décembre 1960

Le Recteur de l'Académie

Président du Conseil de l'Université

P. IMBS

